



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Estudio de la prevalencia de infecciones producidas por el
Virus Diminuto del Ratón (MVM) en Bioterios de Argentina y
su influencia en la contaminación de tumores trasplantables.**

Autor: Lic. Juan Martin Laborde

Directora: Prof.MV Cecilia Carbone

Codirectora: Dra. Cecilia Galosi

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) y Laboratorio de la
Cátedra de Virología (LAVIR)- FCV-UNLP**

Miembros del jurado:

Dra. Diana Bacigalupe

Dr. Victor Fernandez

Dr. Federico Gullace

2017

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A mi directora, Prof. Cecilia Carbone por confiar en mí y su constante estímulo en mi formación profesional y académica.

A la Dra. Cecilia Galosi, por aceptarme incondicionalmente en la codirección de este trabajo, enseñarme las técnicas de laboratorio, compartir las incontables horas en la realización de los experimentos, la permanente y generosa solicitud y paciencia durante el procesamiento de los resultados. Sin ella el esfuerzo que significó este proyecto me hubiese superado.

Al Dr. Rovilson Giglioli y la Dra. Ana María Guaraldo del CEMIB/UNICAMP por su amistad y ayuda en todo momento durante los días lejos de casa y por la donación de muestras necesarias en la realización de esta tesis.

A mis compañeros del LAE, por su generosa, continua e importante ayuda. Por las charlas, las risas, la confianza, el compañerismo y la amistad diaria.

Al Dr. Santiago Corva, por sus importantes aportes y su colaboración en el análisis estadístico de los datos.

Al Dr. Hernán Sguazza por su amistad y ayuda en mis primeros pasos con las técnicas moleculares.

Al personal del LAVIR, gente linda y amable en cada momento que puse un pie en sus laboratorios y donde pude realizar muchas de las tareas que fueron parte de esta tesis.

A la Dra. Adriana Massone de la Cátedra de Patología Especialy Necropsias por su colaboración en los ensayos con tumores en ratones.

A Belén, mi compañera de vida, por su ayuda, su apoyo y un amor que es más fuerte que todos los desencuentros.

A Tiziana mi hija que me renueva las ganas de vivir y seguir adelante todos los días.

Fernando y Sebastián, mis hermanos amigos en quienes siempre puedo confiar.

A mis padres que los perdí hace tiempo pero sé que los sentimientos y emociones son como cartas para ellos.

A todos los que de alguna manera estuvieron y están siempre a mi lado.

“No tengo ningún dios. Si lo tuviera, le pediría que no me deje llegar a la muerte: no todavía. Mucho me falta andar. Hay lunas a las que todavía no ladré y soles en los que todavía no me incendié. Todavía no me sumergí en todos los mares de este mundo, que dicen que son siete, ni en todos los ríos del Paraíso, que dicen que son cuatro. En Montevideo hay un niño que explica: -Yo no quiero morirme nunca, porque quiero jugar siempre.”

Eduardo Galeano

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS (2010-1016)

ELISA simple para la detección de rutina de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón (MVM) en colonias de ratones. JM Laborde, H Sguazza, N Fuentealba; C Carbone, C Galosi. Revista Argentina de Microbiología. Aceptado para su publicación, año 2017.

Influencia de contaminaciones causadas por microorganismos oportunista en ratones de la cepa BALB/cFOX1^{nu} trasplantadas con la línea tumoral humana A549. M Ayala, P Cagliada, S Milocco, M Carriquiriborde, JM Laborde, F Gentil, A Resasco, F Maschi, G Principi, C Carbone. Analecta Veterinaria. Vol 33 (2): 5-8. ISSN 1514-2590 electronica, año 2013.

Estudio de la prevalencia de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en colonias de ratones de la República Argentina. JM Laborde, M Carriquiriborde, P Cagliada, S Milocco, M Ayala, V Cid de la Paz, C Galosi, C Carbone. Revista Medicina. Buenos Aires. Volumen 71 Suplemento III pag: 77, año 2011.

Estudio de la interferencia causada por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones de la cepa BALB/c-CAnN.Cg-Foxn1^{nu} trasplantada con la línea tumoral humana A549. M Ayala, P Cagliada, S Milocco, M Carriquiriborde, F Gentil, JM Laborde, F Maschi, G Principi, C Carbone. Revista Medicina. Buenos Aires Volumen 71 Suplemento III pag: 76, año 2011.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS (2010-2016)

Diagnóstico de agentes virales en pellets de materia fecal en ratones de experimentación. JM Laborde, M Ayala, S Milocco, M Carriquiriborde, P Cagliada, F Gentil, C Carbone. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). Rosario, Pcia Sta. Fé, 26 al 30 de septiembre de 2016.

Sentinel program for health monitoring of animals housed in IVC. P Cagliada, F Maschi, **JM Laborde**, S Milocco, M Carriquiriborde, M Ayala, C Carbone. Congreso SAIC; SAI; SAFE; AACyTAL, Mar del Plata, 16 al 19 de noviembre de 2016.

Microbiological contamination of laboratory mice and rats in conventional facilities in Argentina from 2005 to 2014. M Carriquiriborde, S Milocco, **JM Laborde**, F Maschi, G Principi, E Rogers, F Gentil, A Resasco, P Cagliada, M Ayala, C Carbone. 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório e 3º Encontro Latino Americano de Ciências em Animais de Laboratório. PUCRS, Porto Alegre – RS, 4 al 6 de mayo de 2016.

Evaluación del crecimiento de la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 en ratones inmunodecientes BALB/cFox1^{nu}. XIII Congreso da Sociedade Brasileiro e II Encuentro Latino Americano de Ciencias en Animales de Laboratorio. E Leon, M Ayala, F Maschi, P Cagliada, C Vercellini, **JM Laborde**, M Carriquiriborde, F Gentil, G Principi, S Milocco, S Etcheverry, C Carbone. Porto Alegre, 16 de abril 2014.

Evaluación del crecimiento de la línea celular de osteosarcoma humano mg-63 en ratones inmunodeficientes N:NIH(S)-Foxn1^{nu}.

E León, M Ayala, F Maschi, P Cagliada, C Vercellini, **JM Laborde**, M Carriquiriborde, F Gentil, G Principi, S Milocco, S Etcheverry, C Carbone. Congreso da Sociedade Brasileira de Ciencias em Animais de Laboratorio, 2° Encontro Latino Americano de Ciencias en Animais de laboratorio Porto Alegre, Brasil. Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; Laboratorio de animales de experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, 16 de abril de 2014.

Estudio del desarrollo de las líneas celulares de osteosarcoma humano mg-63 crl 1427 y la de adenocarcinoma de colon colorectal humano ht-29 htb-38 trasplantadas en cepas de ratones inmunodeficientes. C Carbone, M Ayala, P Cagliada, M Carriquiriborde, **JM Laborde**, F Maschi, S Milocco, F Gentil, G Principi, A Resasco. Laboratorio de Animales de Experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP Jornadas de Ciencia y Técnica 2014, 26 - 28 de noviembre de 2014.

Estudio de la interferencia causada por *Staphylococcus aureus* en ratones de la cepa BALB/c-CAnN.Cg-Foxn1^{nu} trasplantada con la línea tumoral humana A549. I Congreso de la Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACyTAL). . M Ayala, S Milocco, A Maschi, G Principi, **JM Laborde**, M Cagliada, M Carriquiriborde, F Gentil, C Carbone. Punta del Este, Uruguay, 12 y 13 de abril de 2013.

ELISA Indirecto para la detección de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en ratones de experimentación. **JM Laborde**, S Corva, H Sguazza, C Carbone, C Galosi. II Congreso Internacional de la Federación de Sociedades Sudamericanas de Ciencias en Animales de Laboratorio (FESSACAL). IV Congreso Nacional, IV Reunión Científica Regional de la Asociación Argentina de Ciencia y tecnología de los Animales de Laboratorio (AACyTAL). I Simposio de Métodos Alternativos, año 2013.

Investigación sobre virus diminuto del ratón utilizando las técnicas de nested-PCR e inmunofluorescencia indirecta, a partir de heces y órganos de ratones BALB/c inoculados experimentalmente. JM Laborde, F Maschi, H Sguazza, V Cid de La Paz, C Galosi, C Carbone. Cátedras de Animales de Laboratorio y Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Calle 60 y 118, 1900 La Plata, Bs. As, Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. Bs. As. 22 al 24 de septiembre de 2014, ciudad Autónoma de Buenos Aires. First International FESSACAL/SBCAL Meeting. Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Universidad de Sao Paulo, Brasil, 4 - 6 de diciembre de 2012.

Detection of mouse minute virus by Nested Polymerase Chain Reaction. JM Laborde, H Sguazza, M Ayala, S Milocco, M Carriquiriborde, P Cagliada, C Galosi, C Carbone. XII Congreso Sociedade Brasileira de Ciencia em Animais de Laboratório. Foz do Iguazú, Brasil, 14 al 16 de marzo de 2012.

Infección experimental con patógenos oportunistas en ratones inmunodeficientes transplantados con la línea tumoral humana A549. M Ayala, P Cagliada, S Milocco, M Carriquiriborde, **JM Laborde**, F Gentil, F Maschi, G Principi, C Carbone. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clinicas-SADEBAC. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 26 al 30 de junio de 2012.

Estudio de la prevalencia de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en colonias de ratones de la República Argentina. JM Laborde, M Carriquiriborde, P Cagliada, S Milocco, M Ayala, V Cid de la Paz, C Galosi, C Carbone. IV Reunión Científica Regional-II Congreso Nacional "Por el bienestar del animal de laboratorio y progreso de la ciencia, LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) Y Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Pcia. Buenos Aires, 15 al 19 de noviembre de 2011.

Contaminaciones Microbiológicas en ratones de laboratorio de Argentina durante el periodo 2005-2009. M Carriquiriborde, **JM** Laborde, S Milocco, F Gentil, P Cagliada, M Ayala, C Carbone. XVIII Reunión Científico Técnica. Mercedes, Corrientes, 3, 4 y 5 de noviembre de 2010.

Indice general

Abreviaturas y símbolos.....	XXI
Resumen.....	2
Palabras clave.....	3
Summary.....	4
Key words.....	5

INTRODUCCION

1-GENERALIDADES.....	7
2-FAMILIA PARVOVIRIDAE.....	21
2.1 Virus Diminuto del Ratón.....	21
2.2 Características estructurales y propiedades físico químicas.....	25
2.3 Replicación Viral.....	26
2.4 Epizootiología de MVM.....	27
2.5 Patogénesis de MVM.....	30
2.6 Asociación de tumor y oncosupresión por MVM.....	34
2.7 Persistencia, estado latente y activación.....	36
2.8 Prevalencia.....	38
2.9 Diagnóstico serológico.....	40
2.10 Diagnóstico por la reacción en cadena de la polimerasa.....	42
2.11 Interferencia en la investigación.....	43
2.12 Prevención y control de MVM.....	47
2.13 Investigación futura.....	49
3-HIPÓTESIS.....	51
4-OBJETIVOS.....	51

5-MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
5.1 Autorización del Proyecto.....	53
5.2 Flujograma de las actividades.....	53
5.3 Virus, sueros de referencia y cultivos celulares.....	55
5.4 Prueba de Hemaglutinación (HA) para la titulación de la semilla viral.....	56
5.5 Producción de Ag para la técnica de ELISA.....	57
5.5.1 Producción de antígeno soluble a partir de células infectadas y tratadas con detergente.....	57
5.5.2 Producción de antígeno con viriones completos.....	58
5.6 Técnica de ELISA.....	60
5.6.1 Titulación del Ag.....	60
5.6.2 Determinación de la dilución óptima de suero.....	61
5.6.3 Reproducibilidad y repetibilidad.....	62
5.6.4 Análisis de un panel de sueros.....	62
5.7 Preparación de láminas teflonadas para su utilización en la técnica de IFI.....	63
5.8 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para MVM.....	65
5.9 Inoculación experimental en ratones BALB/c para la detección de anticuerpos contra MVM por IFI y ELISA y toma de muestras para extracción de ADN a utilizar en PCR.....	67
5.10 Instituciones, información y muestras para el estudio de prevalencia de MVM.....	70
5.11 Muestreo de animales.....	71
5.12 Análisis estadístico.....	72
5.13 Obtención de los controles positivos para los ensayos de PCR.....	73
5.14 Obtención de muestras de ADN de MVM para el control por PCR.....	73
5.15 Extracción de ADN.....	78
5.16 Reacción de la Cadena de la Polimerasa.....	78
5.17 Trasplante de tumores en ratones utilizados en experimentación.....	81

6-RESULTADOS

6.1 Técnica de ELISA.....	85
6.1.1 Titulación del Antígeno.....	85
6.1.2 Repetibilidad y reproductividad.....	89
6.1.3 Análisis de los sueros.....	91
6.2 Técnica de PCR.....	95
6.2.1 Inoculación experimental del antígeno MVM para la estandarización de la técnica de PCR.....	95
6.2.2 Control y prevalencia de MVM mediante la técnica de PCR.....	102
6.3 Estudio de las condiciones higiénico-sanitarias de las instituciones evaluadas.....	107
6.4 Investigación de la interferencia de MVM en líneas tumorales utilizadas en Investigación.....	110
7-DISCUSIÓN.....	116
8-CONCLUSIONES.....	134
9-BIBLIOGRAFÍA.....	137

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de agentes infecciosos que deben ser controlados en ratones (<i>Mus musculus</i>) según las recomendaciones de FELASA.....	14
Tabla 2. Tamaño mínimo de la muestra para la detección de una infección en una colonia de 100 o más animales.....	17
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como sueros positivos y negativos de referencia.....	66
Tabla 4. Inoculación de ratones BALB/c con una solución de sobrenadante de células BHK-21 infectadas con MVM (HA 1/2048). La colecta de sangre de los animales inoculados fue a los 21 y 28 días pos inoculación. La cardiocentesis se realizó en 3 animales (inoculados por diferente vía) cada día. La obtención de sueros de los animales control (sin inocular) fue a los 14, 21 y 28 días pos inoculación.....	69
Tabla 5. En el esquema se observa la toma de muestras durante la experiencia de todos los grupos de animales inoculados y control.....	76
Tabla 6. Se detalla la secuencia de Oligonucleótidos utilizados y las condiciones de la reacción de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los cebadores.....	79
Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de 460 sueros de bioterios convencionales analizados por IFI (técnica “gold standard”) y ELISA indirecto.....	93

Tabla 8. Muestras controladas por PCR de animales infectados en forma experimental con MVM por diferentes vías. Entre paréntesis se muestra el número de días con resultado positivo (+) para el virus por PCR (muestra de órganos o heces) o IFI (suero).....99

Tabla 9. Tabla indicativa de los resultados de los controles de pool de heces (n=46) por PCR (positivos y negativos) para MVM y MPV. Cada muestra de pool de heces se corresponde con un bioterio de ratones.....103

Tabla 10. Tabla indicativa de los resultados de los controles de bazos (n=460) por PCR (positivos y negativos) para MVM y MPV.....103

Tabla 11. Tabla indicativa de los resultados de los controles de bazos (positivos y negativos) para MVM en relación a los 46 bioterios (n=46) por PCR para MVM y MPV. La muestra de cada bioterio son 10 animales/bazos y se considera bioterio/colonia positiva (MVM y/o MPV) si uno o más bazos dan positivo por PCR.....104

Tabla 12. Resultados de prevalencia para MVM en base a la técnica utilizada. Se colocaron los resultados de todas las técnicas para una mejor comparación de los mismos. Se observa que la prevalencia es mayor (23,71 %) por PCR debido a la sensibilidad de la técnica en comparación con las técnicas serológicas.....105

Tabla 13. Barreras sanitarias evaluadas en los bioterios seleccionados.108

Índice de figuras

Figura 1. Valores de similitud genética entre el hombre y otras especies expresados en porcentaje.....	9
Figura 2. Representación esquemática de un parvovirus.....	26
Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación de un parvovirus.....	27
Figura 4. Diagrama de flujo de las actividades implementadas en el desarrollo de este trabajo de tesis	54
Figura 5. Esquema de la técnica de hemaglutinación para la titulación de la semilla viral.....	57
Figura 6. Imagen representativa de la centrifugación para concentración obtención de viriones de MVM. La banda más opaca en el centro del tubo se corresponde con una mayor concentración de los mismos.....	59
Figura 7. Titulación de Antígeno (Ag). Esquema indicativo sobre la disposición de las diluciones del Ag y de sueros de referencia.....	61
Figura 8. Esquema de la prueba de ELISA.....	63
Figura 9. Dilución de la semilla viral colocada sobre células L929 desarrolladas en los pocillos de las láminas teflonadas.....	64
Figura 10. Cultivo de células L929 en láminas teflonadas (aumento 10X).....	64

Figura 11. Lámina multitestes infectadas con MVM para realizar IFI producidas en LAE y Cátedra y Laboratorio de Virología (LAVIR) para control de sueros de bioterios de Argentina.....	66
Figura 12. Lámina multitestes para IFI con MVM producidas en LAE y Cátedra de Virología para control de sueros positivos y negativos de referencia (CEMIB-UNICAMP).....	67
Figura 13. Detalle de las inoculaciones en ratón: A (oral), B (intraperitoneal) y C (intravenosa).....	69
Figura 14. Gráfico representativo del número de bioterios controlados de Argentina durante los años 2010-2015. La mayoría de los mismos se encuentran en la Provincia de Buenos Aires.....	70
Figura 15. Diagrama de flujo de las actividades desarrolladas para la producción de controles (positivo y negativo) para los ensayos de PCR en el diagnóstico de MVM. Los ensayos de las inoculaciones experimentales fueron desarrollados en instalaciones (Cabina Aisladora) pertenecientes al LAE.....	75
Figura 16. Detalle de la región de toma de muestras (linfonodos mesentericos) de un ratón infectado con MVM para extracción de ADN.....	77
Figura 17. Región del íleon (Placas de Peyer) de un ratón infectado con MVM.....	77
Figura 18. Diagrama de tareas en la interferencia de desarrollo tumoral de trasplante por MVM en los 4 grupos de ratones NUDE e investigación de contaminación por MVM en líneas tumorales utilizadas en LAE.....	82

Figura 19. Ratones Nude en los que se ha realizado trasplante de la línea tumoral A549.....	83
Figura 20. Técnica de Hemaglutinación.....	86
Figura 21. Análisis por SDS-PAGE. Línea M: marcador de PM con el tamaño de bandas indicado. Línea 1: dilución 1:100 del Ag de ELISA. Las flechas indican las bandas de las proteínas virales y el PM entre parentesis: VP1/NS1 (83-85kDa), VP2 (64kDa) and NS2 (25 kDa). Línea 2: sobrenadante de 36 h de cultivo de células NHK-21 infectadas simultáneamente con MVMp. Se observa una banda de 66kDa correspondiente a la seroalbúmina bovina.....	87
Figura 22. Imagen de placa de titulación del Ag por la técnica de damero.....	88
Figura 23. Se muestran los valores de las diluciones del Ag utilizado durante el desarrollo del ELISA. Claramente se observa que en la dilución 1/3200 existe una mayor discriminación (OD) entre el suero positivo y el negativo. La dilución del antígeno 1/3200 fue utilizada posteriormente en el ELISA para controlar los 460 sueros.....	89
Figuras 24 y 25. En el diseño de gráficos se observa la repetibilidad intra e interplaca en el ELISA desarrollado.....	90 y 91
Figura 26. Placa que muestra los resultados que se obtuvieron al realizar un ELISA con diferentes sueros.....	92
Figura 27. En la gráfica se observan sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA desarrollada.....	93

Figura 28. Inmunofluorescencia indirecta positiva para MVM (48 hs pi) en células L929. En estadios tempranos de de infección se observa fluorescencia en el núcleo (se observa en algunos núcleos de la foto) mientras que en estadios posteriores es el citoplasma el que fluoresce (más común de observar por esta técnica) sin límites definidos. En el núcleo se produce una aglomeración (grumos) de la cromatina que se separa en bloques producto del ECP viral. Aumento 400X.....94

Figura 29. Gel de agarosa donde se observa una banda específica de acuerdo con el tamaño predicho (640pb) para MVM que se observó en todas las muestras positivas, mientras que no se observó amplificación en el control negativo.....97

Figura 30. Gel de agarosa donde se observa una banda específica de acuerdo con el tamaño predicho (300pb) para MPV que se observó en todas las muestras positivas, mientras que no se observó amplificación en el control negativo. La muestra n° 1 es positiva para MPV (débil) y MVM al observarse banda en 300 pb y 640 pb respectivamente.98

Figura 31. Inoculación experimental en ratones BALB/c. En la gráfica se observa el derramamiento viral (muestra de pool de heces por PCR), la seroconversión (sueros controlados por IFI). También se observa la variación en la detección de MVM en bazo, ganglios linfáticos mesentericos y glándulas de Peyer (muestras controladas por PCR).....99

Figura 32. Inoculación experimental en ratones BALB/c. En la gráfica se observa la detección temprana de MVM (a los 3 días) y el posterior descenso del derramamiento viral (muestra de pool de heces por PCR) a medida que la seroconversión aumenta y llega al punto máximo (sueros controlados por IFI). También se observa la variación en la detección de MVM en Bazo (muestras controladas por PCR) inclusive hasta el final de la experiencia (día 49).....100

Figura 33. En la figura se observa la estabilidad de MVM en el ambiente al comparar los resultados de detección viral (PCR) en las muestras de heces conservadas a -70°C y muestras que se dejaron a T° ambiente por 7 días antes de procesarlas. Se observa también el descenso del derramamiento viral en los ratones cuando asciende (trazo color negro) el número de animales seropositivos por IFI.....101

Figura 34. Esplenomegalia (derecha) observada en ratones BALB/c luego de una inoculación experimental con MVM por vía intraperitoneal. El control por PCR de una muestra del bazo fue positivo para MVM. Bazo de ratón control (izquierda) fue negativo para MVM.....102

Figura 35. Resultados de ratones de diferentes cepas positivos para MVM según la técnica utilizada.....104

Figura 36. Prevalencia de MVM en los bioterios controlados según la técnica utilizada (IFI, ELISA y PCR) con un n=460.....106

Figura 37. Comparación de resultados positivos para parvovirus genérico (PAR=MVM y MPV) en los bioterios controlados según las técnicas de IFI, ELISA y PCR con un n=460. Se observa que la prevalencia por PCR Y ELISA se incrementa debido a los animales que fueron positivos a MPV y negativos a MVM.....107

Figura 38. Se observa el porcentaje de bioterios analizados y separados en grupos en base a las barreras sanitarias que posee de un total de 46 bioterios (13 bioterios del Grupo C, 31 del Grupo B y 2 del Grupo A). No se encontraron bioterios con barreras sanitarias suficientes para la producción de animales SPF.....109

- Figura 39.** Porcentaje de bioterios positivos para MVM siendo 13 bioterios del Grupo C y 9 del Grupo B. El Grupo A no tuvo resultados positivos para MVM.....110
- Figura 40.** Corte de pulmón de ratón NUDE (inoculado con T-A549 y MVM). No se observan lesiones de origen tumoral. Aumento 10X.....111
- Figura 41.** Corte de pulmón sano de ratón NUDE (inoculado con T-A549 y MVM). En detalle células del tejido aerolar. No se observan lesiones de origen tumoral. Aumento 20X.....112
- Figura 42.** Toma de muestra de pulmón. Corte de tejido tumoral (A549) de un infiltrado neoplásico en ratones NUDE y tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento 10 X.....113
- Figura 43.** Toma de muestra de pulmón. Corte de tumor y detalle de células neoplásicas con tinción de Hematoxilina-Eosina. Aumento 40X.....114
- Figura 44.** En la gráfica se observa el desarrollo tumoral durante el transcurso de las semanas posteriores al trasplante del mismo. En el Grupo A el tumor tiene un crecimiento inicial y luego comienza a reducirse debido a la acción de la infección de los animales con MVM. En el Grupo B el tumor tiene un desarrollo normal.....115

Abreviaturas y símbolos

A549: línea celular de osteosarcoma de pulmón.

ABTS: azinodietilbenzotiazol-sulfonato.

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxiribonucleico.

Ag: antígeno.

BHK-21: Baby Hamster Kidney (Línea celular).

°C: grado centígrado.

CICUAL: Comité Institucional para El Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

DICC₅₀: dosis infectante cultivo de células 50%.

ECP: efecto citopatogénico.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: enzimo inmuno ensayo.

FELASA: Federación Europea de Asociaciones de la Ciencia de Animales de Laboratorio.

hs: horas.

HT-29 HTB-38: adenocarcinoma colorrectal humano.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

L-929: línea comercial celular de fibroblastos de ratón.

LAE: Laboratorio de Animales de Experimentación.

MEM: medio esencial mínimo.

MEM-M: MEM de mantenimiento.

mg: miligramo.

MG-63 CRL 1427: línea tumoral de osteosarcoma humano.

min: minutos.

ml: mililitro.

MVM: virus diminuto del ratón.
MPV: parvovirus del ratón.
NT: proteína viral no estructural.
PBS: solución *buffer* de fosfato.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
pi: post-infección.
P/V: peso/ volumen.
rNS1: recombinante de proteína no estructural 1.
rVP2: recombinante de proteína estructural 2.
SL: solución de lavado.
SNB: Sistema Nacional de Bioterios.
SFB: suero fetal bovino.
Ta: temperatura ambiente.
UHA: unidades hemaglutinantes.
VP: proteína viral estructural.
V/V: volumen /volumen.
μl: microlitro.

Estudio de la prevalencia de infecciones producidas por el Virus Diminuto del Ratón (MVM) en Bioterios de Argentina y su influencia en la contaminación de tumores trasplantables.

Resumen

La presencia de agentes infecciosos en colonias de animales de laboratorio representa un serio problema en las investigaciones biomédicas. Algunos microorganismos patógenos pueden inducir signos clínicos o causar infecciones subclínicas. La presencia de estos agentes puede modificar parámetros fisiológicos y producir alteraciones significativas en los resultados experimentales. Entre los virus murinos presentes en colonias de ratones se destaca el **Virus Diminuto del Ratón** (MVM) perteneciente a la *Familia Parvoviridae* considerado un virus de alta prevalencia en colonias de ratones y un contaminante de algunos stock de virus y de tumores trasplantables. Como todos los parvovirus, la dependencia de la replicación del MVM por funciones moduladas por la proliferación, diferenciación y transformación celular indica que el virus requiere de células en división para replicarse. La misma se produce en diversos órganos como el páncreas, intestino delgado, órganos linfoides, hígado y riñones. Este virus se libera y transmite a través de las heces y la orina, donde puede persistir durante varias semanas. Los animales sanos se infectan al ponerse en contacto con el animal enfermo o con sus heces y orina. El virus ingresa por vía oronasal para luego diseminarse. La signología clínica se manifiesta diferente en animales inmunocompetentes y en inmunodeficientes. En general, en los primeros no se manifiesta la enfermedad clínica a menos que estén sometidos a un estrés, mientras que en los segundos es más frecuente observar alteraciones en su comportamiento y en su anatomofisiología. También puede reducir la tasa de crecimiento tumoral directamente o impedir su desarrollo (oncólisis), altera la modulación de la respuesta inmune de las células tumorales, interfiere con la selección de nuevos trasplantes y provoca una reducción química de los tumores. Por todas estas razones, el desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles y precisas permite conocer la eficiencia de los sistemas de barreras sanitarias instaladas en las colonias, obtener datos más representativos de la prevalencia de este virus con el fin de conocer la magnitud de la infección y poner en práctica las medidas de control adecuadas. Actualmente el diagnóstico de MVM se realiza a través de la detección serológica de anticuerpos antivirales en el huésped o por

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de suero, órganos o heces. La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) fue la primera técnica utilizada para la detección de anticuerpos (Ac) pero se requiere de grandes cantidades de antígeno viral. Más recientemente, las dos técnicas serológicas más usadas son la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático (ELISA). La técnica de IFI es una prueba fácil de realizar para un pequeño tamaño en las muestras de suero mientras que ELISA es una técnica automatizada alternativa, sensible y específica comúnmente utilizada para un gran número de muestras. El diagnóstico del parvovirus del ratón (MPV) aislado en los últimos años, que también debe estar ausente en ratones utilizados en experimentación, puso en perspectiva los resultados serológicos positivos contra MVM debido a que en la mayoría de las técnicas serológicas presenta reacción cruzada con MVM, siendo necesario contar con técnicas complementarias que permitan discriminar ambos virus. El objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia de infecciones por MVM en colonias de ratones de Argentina y estudiar la influencia de este virus en la contaminación de tumores transplantables. Para lograr estos objetivos se procederá a estandarizar una técnica de ELISA para la detección de Ac contra MVM, a determinar la prevalencia de MVM en colonias de ratones en Argentina a través de la comparación de las técnicas de ELISA e IFI, a desarrollar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN viral de MVM y MPV que permita discriminar los resultados serológicos de ELISA e IFI en ratones provenientes de diferentes colonias y a estudiar la detección e interferencia de la contaminación por MVM en tumores transplantables en ratones.

Palabras clave: Virus diminuto del ratón, ELISA, PCR, Prevalencia.

Summary

The presence of infectious agents in laboratory animal colonies represents a serious problem in biomedical research. Some pathogens can induce clinical signs or cause subclinical infections. The presence of these agents can modify physiological parameters and produces significant alterations in the experimental results. Among the murine viruses Minute Virus of Mice (MVM) belonging to the family Parvoviridae is considered a highly prevalent virus in mice colonies and a contaminant of some stock of virus and transplantable tumors stand out. Like all parvovirus, MVM replication, proliferation, differentiation functions and cell transformation indicates that the virus requires dividing cells to replicate. The same occurs in various organs such as the pancreas, small intestine, lymphoid organs, liver and kidneys. This virus is released and transmitted through feces and urine and it can persist for several weeks. Healthy animals become infected by contact with sick animals or their feces and urine. This virus enters via oronasal and then spread to the different organs mentioned above. The Clinical disease is shown differently in immunocompetent and immunodeficient animals. Usually, immunocompetent animals do not show clinical disease unless they are subjected to stress, while in immunodeficient strains is more common to observe changes in the behavior and in the anatomophysiology. MVM virus can reduce tumors growth rate directly or prevent their development (oncolysis), it can also alters the modulation of the tumor cells immune response, and consequently interferes with the tumor growth. For all these reasons, the development of sensitive techniques for the detection of MVM allows know the efficiency of barrier systems implemented in mice colonies contributes with de obtencion of representative prevalence data and in this way contributes with the improvement of the facilities sanitary programs. Currently MVM diagnosis it is performed by serological detection of antiviral antibodies in the host or by polymerase chain reaction in serum samples, organs or feces. Hemagglutination inhibition assay (IHA) was the first technique used to detect antibodies however it requires large amounts of viral antigen. More recently, the two serological techniques most commonly used are

indirect immunofluorescence (IIF) and enzyme immunoassay (ELISA). IIF technique is an easy test for a small size serum samples while ELISA is an alternative, sensitive and specific automated technique commonly used and suitable for a large number of samples. Mouse parvovirus (MPV) diagnostic, isolated in recent years, put into perspective positive serological results against MVM because in most serological techniques there is a cross-reaction with MVM, thus, it is necessary to perform complementary assays in order to discriminate both viruses. It is important to mention that MPV must also be absent in mice used in experiments. The objective of this study is to determine the prevalence of MVM infections in mice colonies in Argentina and to study the influence of this virus in the contamination of transplantable tumors. To achieve these goals an ELISA technique for the detection of Ab against MVM will be standardized, the prevalence of antibodies against MVM in mouse colonies in Argentina will be determined through the comparison of an ELISA and IIF test, a polymerase chain reaction (PCR) technique will be developed in order to detect viral DNA of MVM and MPV that will allow to discriminate ELISA and IIF serological results of and the interference from contaminations by MVM will be studied in transplantable tumors in this rodents.

Key words: Minute virus of mice, ELISA, PCR, Prevalence.

Introducción

1. Generalidades

La ciencia de los animales de laboratorio es considerada una parte importante en el desarrollo de las investigaciones biomédicas y aunque actualmente existe una tendencia creciente para la aplicación de sistemas biológicos *in vitro*, como moléculas aisladas y cultivos de células, la utilización de metodologías alternativas con modelos matemáticos y simulaciones computarizadas, la investigación biomédica todavía depende de los resultados obtenidos de la experimentación animal (Coates, 1992; Fosse, 1994; Holst, 1994; Pelkonen, 1994; Rowan, 1997; Tamaoki, 1999).

En este contexto el animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las investigaciones en las que se usa como modelo para investigar y entender las causas, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales. Además, hay que considerar los importantes aportes debido al uso de animales para la docencia en el área de la biología y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles. Asimismo el uso de los animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas ha contribuido con los importantes avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades transmisibles y no transmisibles. Basta recordar el hallazgo de las vacunas contra la rabia, viruela, tétanos, difteria, tos convulsa y poliomielitis; el desarrollo de diversos antibióticos, la insulina y el conocimiento de las bases genéticas de la herencia. Los avances de la investigación en oncología, cardiología, trasplantes de órganos, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, enfermedad de Alzheimer y en la actualidad los resultados exitosos para el desarrollo de una vacuna contra el virus Zika, también se deben a las contribuciones de los estudios realizados en animales de laboratorio (Frieden, 2016; Zuñiga y col., 2001).

Un animal de laboratorio se define como “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos” (Zuñiga y col., 2001). Cuando hablamos de animales de laboratorio nos referimos a un

reactivo biológico, este es un animal estandarizado, lo cual significa que debe tener una composición genético-sanitaria definida, haberse criado y mantenido en un ambiente controlado que cumpla con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garanticen además el bienestar animal, por lo que su calidad genética debe ser vigilada, controlada y contrastada, al igual que cualquier reactivo, sin descuidar su posible contaminación biótica (Graham, 2015; Fernández y col., 2016).

Durante años, los científicos han considerado al ratón de laboratorio (*Mus musculus*) como uno de los mejores modelos para investigar enfermedades humanas por la similitud genética entre ambos mamíferos. Se considera que el ratón es, después del humano, el segundo organismo mejor conocido en términos de su biología. A lo largo de los últimos 85 años el catálogo de ratones producidos por los se ha incrementado en más de 3.300 entre cepas y stocks. Se debe considerar que la cría de ratones adquirió un nuevo ímpetu a partir de la secuenciación del genoma del ratón (año 2002) y luego del humano (año 2003), esto permitió confirmar cuán similares son ambas especies genéticamente (88%) donde las diferencias tienen que ver con cuando y donde son activados los genes. La noción de las modificaciones genéticas explica la desconcertante sorpresa de que los genes humanos no son únicos y que compartimos varios de ellos con otras especies, es así que a través del desarrollo de esta tecnología, salió a la luz el hecho de que no sólo recibimos el mismo número de genes que un ratón (menos de 21.000) sino que en la mayoría de los casos heredamos exactamente los mismos. Asimismo como no se necesitan palabras diferentes para escribir libros diferentes, para las distintas especies no hacen falta nuevos genes, solo se requiere cambiar el orden y el patrón con que se utilizan (Hendriksen, 2009). La Figura 1 muestra el porcentaje de similitud genética que posee el hombre con otras especies.

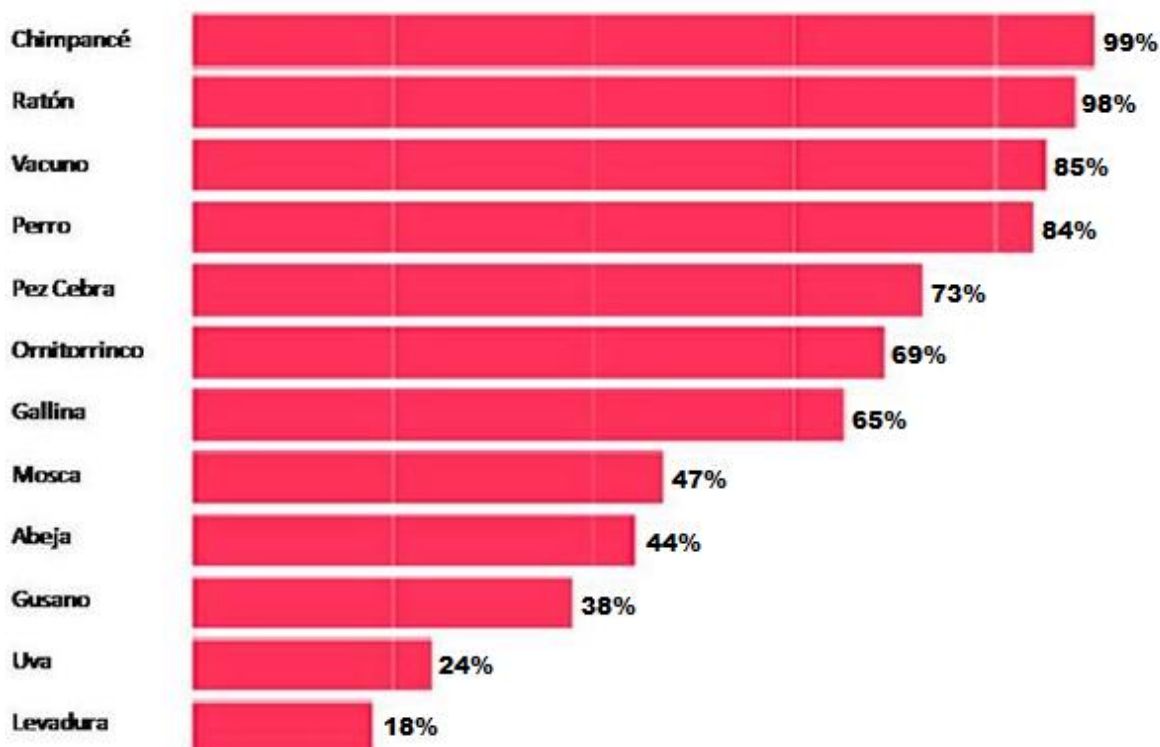


Figura 1. Valores de similitud genética entre el hombre y otras especies expresados en porcentaje. <http://www.microsiervos.com/archivo/ciencia/adn-parecido-seres-humanos.html>.

En los animales que se utilizan en experimentación es fundamental establecer y mantener su calidad sanitaria, para ello deben llevar un registro y control de su estado de salud y particularmente de su condición microbiológica. Esta última está determinada por un complejo multifactorial en el que interactúan la biología del animal, el perfil genético, las condiciones ambientales del alojamiento, así como las prácticas y manejo al que son sometidos estos animales y sus insumos (Baker, 1998; Casebold y col., 1997; Goto y col., 1998).

Según los estándares internacionales y de acuerdo con la presencia o ausencia de microorganismos Los animales de experimentación se clasifican en animales convencionales, que son los que no están infectados con patógenos zoonóticos, los Libres de Patógenos Específicos (SPF, según la sigla en inglés), aquellos en los cuales están ausentes una lista de microorganismos consensuada internacionalmente, los axénicos o libres de gérmenes (GFA) en los que no se

detecta ningún microorganismo por los métodos hasta ahora conocidos, incluso su flora intestinal normal que está ausente y los gnotobiotas que son animales GFA infectados con uno, dos o más microorganismos, es decir que en estos últimos se conocen precisamente los patógenos presentes (Goto y col., 1998).

Los agentes microbianos patógenos presentes en las colonias de animales de laboratorio causan alteraciones en los resultados experimentales y en la interpretación de los mismos. No solamente existe el riesgo de transmisión de enfermedades a los humanos sino que también se han podido observar muertes de animales en bioterios; cambios en los parámetros fisiológicos normales; contaminación de materiales biológicos tales como sueros, vacunas y anticuerpos monoclonales; y pérdida de las colonias de animales inmunodeficientes (Hendriksen, 2009). Asimismo deben considerarse los aspectos concernientes a la actitud ética y moral frente al uso de modelos animales. En este sentido la estandarización sanitaria, la ausencia de contaminaciones y la preservación de un buen estado de salud forma parte del principio de las tres erres de Russel y Burch que son: la reducción del número de animales que se utilizan en investigaciones y ensayos, el refinamiento de los procedimientos experimentales a los que se los somete y el reemplazo de los mismos por métodos alternativos siempre que sea posible (Balls, 2009).

En la actualidad entre los investigadores se plantea una discusión entre el significado de infección versus enfermedad pues no se interesan únicamente en la salud del animal sino en aquellos patógenos que contaminan a los animales en forma asintomática pero que igualmente interfieren con los resultados experimentales. Debido a la resistencia innata o adquirida, la mayoría de los animales infectados con microorganismos no muestran signos clínicos aparentes de enfermedad. Por lo tanto, la infección puede pasar desapercibida por el personal que cuida y utiliza los animales en el laboratorio durante una experiencia o por aquellos que trabajan en áreas de producción. Por ese motivo actualmente, es importante el uso de animales de laboratorio libres de patógenos específicos (SPF) para utilizarse como modelo en investigación, productos farmacéuticos humanos y veterinarios y reactivos biológicos (Fentener Van Vlissingen, 2015).

Para el control de calidad de los animales de laboratorio se están desarrollando normas por parte de los centros que los producen, las que se van actualizando en forma continua. Como ya se ha mencionado, se debe tener en cuenta que al igual que los productos químicos, los animales de laboratorio son reactivos biológicos y su nivel de calidad siempre debe ser un requisito para aquellos que los utilizan. Se los puede comparar con instrumentos de medida que deben estar calibrados para obtener resultados precisos. Con el avance de la investigación biomédica, la sofisticación de los experimentos con animales está aumentando rápidamente y se requieren resultados experimentales cada vez más exactos. Por lo tanto, se necesita establecer esta estandarización para confirmar y en lo posible, asegurar la reproducibilidad de los resultados de las investigaciones utilizando un número mínimo de animales (Smith y col., 2007).

Desde el punto de vista histórico la vigilancia de la salud de los animales de laboratorio ha transitado por diferentes etapas. En sus inicios (1880-1960) el objetivo era evitar la muerte de los animales. Luego se sumó el interés por el desarrollo de técnicas como la derivación por cesárea para la obtención de animales gnotobióticos (1960-1985) y lograr de esta manera minimizar los patógenos en las colonias. Posteriormente (1980-1996) el objetivo fue la erradicación de virus murinos endógenos a través de la optimización de técnicas de diagnóstico como las pruebas serológicas y mejoras en la cría y mantenimiento de animales de laboratorio. En la actualidad el interés se centra en el desarrollo de nuevos modelos animales como los ratones transgénicos, lo cual trajo como consecuencia la aparición de enfermedades emergentes como las infecciones por *Helicobacter spp*, nuevos parvovirus y norovirus murinos (Fentener Van Vlissingen, 2015).

Los métodos utilizados para determinar la calidad sanitaria de los animales incluyen los programas de controles sanitarios, los controles microbiológicos esporádicos u ocasionales y la encuesta microbiológica.

Los programas sanitarios se realizan según las necesidades de cada bioterio y refieren a la planificación y ejecución de un proceso que se lleva a cabo

continuamente en las colonias y que puede incluir diferentes formas o técnicas para evaluar la presencia de microorganismos.

El control microbiológico hace referencia a la práctica de pruebas repetitivas estandarizadas, previamente descritas y programadas para mostrar la presencia de ciertos agentes microbianos en una colonia animal. Es el principal mecanismo para asegurar en forma continua la calidad microbiológica de los animales y forma parte de los programas de controles sanitarios.

Los controles esporádicos u ocasionales, son pruebas específicas con el fin de identificar los probables patógenos causantes de los cambios clínicos y las lesiones observadas. Estas pruebas no están programadas como en los controles microbiológicos y se realizan generalmente, después de determinados hallazgos como por ejemplo aparición de animales enfermos o muertos. Las infecciones se evidencian cuando se observan signos clínicos de enfermedad o a través de los resultados obtenidos de una necropsia. Cuando un patógeno contamina una colonia y los animales se enferman, se observan signos clínicos y/o lesiones características del agente etiológico tales como diarrea, secreción nasal, conjuntivitis, letargo, parálisis de los miembros, pérdida del equilibrio, pelo hirsuto, emaciación, disminución de la productividad, muerte de lactantes, neumonía, hepatitis, enteritis y muerte súbita de animales adultos (Besselsen, 2008).

Los relevamientos microbiológicos se refieren al resultado de pruebas que se realizan para conocer la prevalencia de agentes infecciosos en los animales de laboratorio y proporcionan información sobre la incidencia de contaminaciones microbianas en las colonias durante un período.

La calidad sanitaria es el resultado directo del programa de gestión del bioterio y de las prácticas de control sanitario en los animales. Esto es de gran importancia cuando se implementa en las colonias que se mantienen bajo un sistema de barreras sanitarias de protección, que impiden o minimizan el ingreso de microorganismos y donde el estricto control sanitario garantiza la eficiencia de los sistemas de bioseguridad adoptados. En estas condiciones, los microorganismos que se someten a control incluyen una amplia lista de potenciales patógenos específicos de cada especie.

En las colonias que se mantienen en condiciones convencionales con mínimas barreras sanitarias, el control de los microorganismos se limita obligatoriamente a todas las zoonosis y a los agentes de alta patogenicidad específicos de la especie animal alojada que puedan afectar de manera significativa el curso de los experimentos. En el caso de los animales SPF se controlan además de los anteriores, una lista de patógenos (Tabla 1) consensuada y en correspondencia con los estándares internacionales en la que se incluyen los microorganismos de alta prevalencia y distribución mundial capaces de infectar a la colonia y de producir alteraciones en las investigaciones y ensayos. En el caso de este trabajo se consideró la lista de la Federación Europea de Sociedades de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA) (Malher y col., 2014).

Tabla 1. Lista de agentes infecciosos que deben ser controlados en ratones (*Mus musculus*) según las recomendaciones de FELASA (Malher y col., 2014).

	Cada 3 meses	Anual
Virus		
Virus de la hepatitis del ratón	x	
Rotavirus del ratón	x	
Norovirus murinos	x	
Parvovirus:		
Virus diminuto del ratón	x	
Parvovirus del ratón	x	
Virus de la Encefalomiелitis de Theiler	x	
Virus de la Linfocoriomeningitis		x
Adenovirus del ratón tipo 1 (FL)		x
Adenovirus del ratón tipo 2 (K87)		x
Virus Ectromelia		x
Virus de la Neumonía del ratón		x
Reovirus tipo 3		x
Virus Sendai		x
Bacterias		
<i>Helicobacter</i> spp.	x	
(se recomienda <i>H. hepaticus</i> , <i>H. bilis</i> and <i>H. typhlonius</i>)		
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	x	
<i>Streptococci</i> <i>β</i> -haemolytic (not group D)	x	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	x	
<i>Citrobacter rodentium</i>		x
<i>Clostridium piliforme</i>		x
<i>Corynebacterium kutscheri</i>		x
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		x
<i>Salmonella</i> spp.		x
<i>Streptobacillus moniliformis</i>		x
Parásitos		
Endo y ectoparásitos (hasta nivel de género)	x	

La precisión y confiabilidad de los resultados que se obtienen mediante los controles microbiológicos depende fundamentalmente de la muestra que se tome de la colonia o grupo de animales. Esta debe ser significativa, científica y estadísticamente válida y debe responder al tamaño de la colonia. Los animales deben ser elegidos al azar de cada unidad dentro de la colonia. Las pruebas serológicas para detección de anticuerpos deben realizarse en los animales adultos inmunocompetentes que han permanecido en la colonia el tiempo suficiente requerido para estar en contacto, contaminarse con el posible agente patógeno y desarrollar anticuerpos. Por lo tanto, los animales elegidos deben ser mayores de ocho semanas, obtenidos de los núcleos de fundación y de expansión de las colonias.

Para los estudios histopatológicos y para los que se realizan a través de la técnica de PCR, se aconseja utilizar animales jóvenes debido a que son más susceptibles a contraer la infección, además, en ellos las lesiones son más evidentes y en estos se pueden multiplicar mayor número de patógenos. Los estudios mencionados se pueden utilizar para observar los ratones con inmunodeficiencias graves que producen poco o ningún anticuerpo como el caso de los ratones *Scid* y *nude* (nu/nu).

Una alternativa para el control de salud de los animales inmunodeficientes es el uso de animales centinelas. Un animal centinela es aquel que posee una condición sanitaria y genética conocida, que se pone en contacto directo o indirectamente con los animales a controlar y actúa reemplazando a los individuos de la colonia. Pueden ser, según el caso, inmunocompetentes y/o inmunodeficientes. Para control de ratones que presenten algún tipo de inmunodeficiencia se utilizan centinelas inmunocompetentes. Es importante tomar precauciones en el uso de animales centinelas, ya que pueden albergar microorganismos no patógenos u oportunistas que pueden resultar peligrosos para las cepas con inmunodeficiencia severa como la *Scid* y en algunos animales de líneas transgénicas y *knock-out*. En estos animales un microorganismo considerado oportunista o perteneciente a la flora normal puede transformarse en patógeno y causar lesiones o incluso una enfermedad mortal. Por lo tanto, se

recomienda realizar controles en una muestra del animal completo proveniente del núcleo de fundación de estas colonias una vez al año, de manera de asegurar la identificación de microorganismos patógenos que no se hubieran aislado en los centinelas (Nicklas y col, 2002; Gaertner y col 2007).

Las muestras para desarrollar las pruebas serológicas deben ser de animales adultos jóvenes (8 a 12 semanas de edad) y adultos mayores (más de 6 meses). Si el bioterio tiene más de una especie animal, cada especie debe controlarse por separado (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

El tamaño de la muestra para detectar la presencia de un agente infeccioso depende del grado de infección de la población animal y el nivel de confianza deseado. El grado de infección está influenciado por varios factores, como la capacidad de infección del patógeno, cepa y la edad del animal, la etapa de la infección, la densidad de población, las técnicas de gestión que se hayan implementado y la instalación de barreras sanitarias (Armitage y col., 1992).

La tabla 2 muestra, la relación entre el grado de infección de la población y el tamaño de muestra necesario para detectar la infección con diferentes límites de confianza. La siguiente ecuación permite calcular el tamaño de la muestra en una población: $A = \log a / \log N$, donde **A** es el número de animales a ser examinados, **a= 0,05** (95% de nivel de confianza) y **N** es porcentaje de animales no infectados.

Tabla 2. Tamaño mínimo de la muestra para la detección de una infección en una colonia de 100 o más animales (Armitage y col., 1992).

LIMITE DE CONFIANZA		
GRADO DE INFECCIÓN(%)	99% ($\alpha = 0,01$)	95% ($\alpha = 0,05$)
	Número de Animales (N)	Número de Animales (N)
10	44	29
20	21	14
30	13	9
40	9	6
50	7	5
60	5	4
70	4	3
80	3	2
90	2	2

La toma de muestras para los controles sanitarios debe cumplir con criterios de ejecución en forma permanente y segura. La frecuencia de los controles depende de la condición sanitaria de los animales. En animales *Germ Free*, libres de gérmenes o *axénicos* que están libres de todo organismo detectable por los métodos hasta ahora conocidos, la frecuencia debe ser cada 15 días mientras que en animales convencionales (libres de zoonosis) puede limitarse a una vez al año. El método tradicional utilizado para controles sanitarios de ratones, ratas (SPF), cobayos y hámsters consiste en tomar una muestra de 8 a 10 animales de cada unidad de alojamiento integrada y distribuida en animales recién destetados, adultos jóvenes y viejos. En las especies mencionadas se aconseja realizarlo con una frecuencia de 3 meses, excepto en las colonias de conejos que se puede realizar cada seis meses (Nicklas y col., 2002).

Actualmente se está imponiendo el uso de racks ventilados para la producción y mantenimiento de animales. En este caso al momento de la toma de

muestra para realizar un control sanitario debe considerarse a cada rack como una unidad o colonia independiente. Los rack ventilados se utilizan habitualmente en el mantenimiento de animales transgénicos. Estos animales además de no ser en general numerosos, son costosos y es frecuente que no se pueda disponer de un número suficiente de animales para realizar el control microbiológico de rutina, lo cual obliga a considerar otras alternativas. Una opción es el uso de animales centinelas los cuales deben provenir de colonias cuyo estado sanitario sea conocido. Los mismos se introducen en el mismo rack donde se mantienen los animales problema durante 3 meses, luego de este período se les realiza el control sanitario, reemplazando así a los transgénicos. (Cagliada y col., 2016).

Otra alternativa para el control de los animales alojados en racks ventilados es tomar muestras de sangre de los animales (gota de sangre) y/o muestras de polvo acumulado en los filtros de salida del aire para luego procesadas por métodos sensibles de detección de patógenos (Compton y col., 2004). Las instalaciones de producción de animales con sistemas de barreras, deben tener un diseño que permita en el caso de detectarse una contaminación en un área, tener la posibilidad de aislar el lugar en forma rápida y evitar la propagación de los agentes infecciosos a otras unidades y es por ese motivo que los intervalos entre los controles sanitarios de los animales no deben ser demasiado espaciados (Clough, 1988).

Los agentes infecciosos de los animales de laboratorio incluyen los de alta y baja patogenicidad incluyendo las zoonosis, los oportunistas y los comensales. La planificación de un programa de control sanitario debe incluir los agentes que se controlaran en las pruebas de diagnóstico y aquellos consensuados en los estándares internacionales. Por razones prácticas es casi imposible controlar todos los agentes infecciosos o todos aquellos que pueden interferir con un estudio en particular. En la selección de microorganismos patógenos se debe tener en cuenta el estado de la salud de la colonia y el propósito del experimento en el que se utilizan los animales. Los diferentes ensayos pueden ser afectados de diversas maneras por patógenos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos. Cuando un patógeno infecta a los animales, su sistema inmunológico se activa y puede

producirse tanto la estimulación como la depresión funcional, por lo tanto con animales en estas condiciones no es posible obtener resultados experimentales confiables y precisos (Ayala y col., 2004).

En la actualidad se han descrito cientos de potenciales patógenos para ratones, ratas, cobayos, conejos y hámsters. Con el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para la detección e identificación de patógenos en animales de laboratorio, la tendencia es el incremento del número de agentes de este listado. Los microorganismos patógenos para los animales de laboratorio deben controlarse teniendo en cuenta su prevalencia, el impacto en los resultados de la investigación, la relevancia del agente a nivel internacional y la disponibilidad de pruebas de diagnóstico. La contaminación de una colonia por un agente infeccioso, se puede afirmar una vez que se lo aisló e identificó correctamente, de lo contrario debe declararse que fueron detectados anticuerpos contra dicho agente en uno o más animales examinados. Una vez detectada la presencia del agente en la colonia, este debe ser informado como presente en el seguimiento posterior, hasta que se haya erradicado por métodos de histerectomía, transferencia de embriones o en caso de la sustitución de la colonia por animales libres de patógenos específicos (Buer y Balling, 2003).

Los virus murinos que afectan a los animales de experimentación son el mayor problema en la investigación inmunológica y oncológica porque los ensayos para investigar los efectos adversos o contraindicaciones en la administración de un fármaco a largo plazo, se apoyan en las valoraciones de la sangre, de histopatología y en los cambios de los parámetros bioquímicos normales y otros que se produzcan en el cuerpo de los animales causados por agentes infecciosos y que pueden afectar los resultados (Compton, 2001).

Los procedimientos utilizados para la certificación de la sanidad animal incluyen pruebas serológicas, cultivo y pruebas bacteriológicas, técnicas moleculares, parasitológicas y exámenes clínicos e histopatológicos. Cada prueba puede incluir varios procedimientos para detectar diferentes agentes infecciosos u otros procesos patológicos. Los programas de certificación sanitaria de los animales dependen de la clasificación sanitaria de los mismos, infraestructura,

equipamiento, número de agentes controlados, la variedad de pruebas de diagnóstico y la frecuencia de dichos controles. Algunos de estos programas se limitan a un único tipo de pruebas, ya sean parasitológicas, bacteriológicas, serológicas o moleculares. Sin embargo, se recomienda utilizar procedimientos estándar dentro de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), integrados en un programa de control de calidad (Shek, 2000). Es importante tener en cuenta que solamente el resultado del conjunto de pruebas puede dar una información confiable sobre la condición sanitaria de un grupo de animales en un momento determinado. De todas maneras se considera que en la planificación de programas de control sanitario de animales de experimentación no existe la certeza absoluta sobre su eficiencia y precisión que asegure la identificación de microorganismos que estén contaminando la colonia.

Muchos agentes virales producen infecciones enzoóticas y asintomáticas que pueden estar presentes en las colonias de animales de laboratorio y pasan desapercibidas por el técnico encargado de la producción o cuidado de los animales del bioterio. Por lo tanto, se deben elegir métodos que puedan demostrar la presencia de estos microorganismos en una colonia.

El diagnóstico viral se basa en el examen directo de material biológico para detectar virus o antígenos virales. Algunos virus o sus antígenos pueden detectarse en el citoplasma o en el núcleo de las células de órganos diana, lesiones, exudados, heces, orina, secreciones respiratorias, sangre y líquido cefalorraquídeo. La eficacia de este procedimiento en la posible detección viral depende de la recolección, conservación y el procesamiento correcto del material clínico. Las técnicas serológicas de ELISA como también inmunohistoquímica e inmunofluorescencia directa (IFA) o indirecta (IFI) y las técnicas moleculares como la PCR, son ejemplos de métodos de diagnóstico rápido. Esta técnica permite detectar directamente la presencia del ácido nucleico del agente (Besselsen, 1998).

Para el aislamiento del virus se puede realizar la técnica de PCR o utilizar el material biológico bajo sospecha para realizar una inoculación en sistemas sensibles y obtener la replicación viral. Estos pueden ser: cultivos celulares,

huevos embrionados o animales lactantes. Los signos de la multiplicación del virus en estos sistemas incluyen:

- Efecto citopático característico en cultivos de células: la formación de sincicios (MHV, ectromelia, citomegalovirus), o muerte celular (Sendai, TMEV, REO, parvovirus).
- Muerte del embrión, presencia de placas en formación en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados inoculados con la muestra o hemaglutinación del líquido amniótico o membrana corioalantoidea (Sendai, Ectromelia).
- Signos neurológicos (TMEV) y muerte de los animales lactantes inoculados.

La efectividad de la prueba depende del momento de la toma de muestra (etapa infecciosa de la enfermedad) y del tiempo de procesamiento de la misma. Asimismo, posteriormente deben realizarse otras pruebas directas como la microscopía electrónica o técnicas serológicas adicionales, tales como IHA, ELISA, IFA, IFI o seroneutralización para identificar el virus aislado. La técnica de PCR permite detectar directamente la presencia del ácido nucleico del agente (Kraft y col., 1994).

2. Familia *Parvoviridae*.

2.1 Virus diminuto del ratón.

El virus diminuto del ratón (MVM, del inglés *Minute virus of mice*) forma parte de la familia *Parvoviridae* (del latín *parvus* = pequeño) que incluye a virus que infectan a vertebrados e invertebrados, están filogenéticamente relacionados y probablemente derivan de un ancestro común ya que comparten propiedades biológicas (Ward y Tattersall, 1978; Berns, 1984; Astell, 1999). Esta familia viral se encuentra actualmente en proceso de reclasificación y sus miembros se agrupan en dos subfamilias, la subfamilia *Densovirinae* (virus de los invertebrados) integrada por cinco géneros y la subfamilia *Parvovirinae* (virus de los vertebrados)

constituida por ocho géneros. Los parvovirus que infectan a los roedores, entre ellos el MVM se encuentran dentro del género *Protoparvovirus*.

Familia Parvoviridae, subfamilia Parvovirinae, Género Protoparvovirus, Virus que infectan a los roedores. Clasificación propuesta por el Comité internacional de taxonomía viral (extraído de <http://ictvonline.org>).

Rodent protoparvovirus 1

H-1 parvovirus

H-1 parvovirus (H1)

Kilham rat virus

Kilham rat virus (KRV)

Lull virus

Lull virus (Lull)

Minute virus of mice

Minute virus of mice (prototype) (MVMp)

Minute virus of mice (immunosuppressive) (MVMi)

Minute virus of mice (Missouri) (MVMm)

Minute virus of mice (Cutter) (MVMc)

Mouse parvovirus 1

Mouse parvovirus 1 (MPV1)

Mouse parvovirus 2 (MPV2)

Mouse parvovirus 3 (MPV3)

Mouse parvovirus 4 (MPV4)

Mouse parvovirus 5 (MPV5)

Hamster parvovirus (HaPV)

Tumor virus X

Tumor virus X (TVX)

Rat minute virus 1 (RMV1)

Rodent protoparvovirus 2

Rat parvovirus 1 (RPV)

El estudio de los parvovirus que infectan a los roedores tiene su origen cuando el MVM, virus Kilham de la rata (KRV) y virus Toolan (H-1) fueron descubiertos como contaminantes de cultivos de células, al igual que la mayoría de las especies de parvovirus (Toolan, 1960; Kilham, 1961; Crawford, 1966; Bonnard y col., 1976; Besselsen y col., 1996).

Dos especies infectan naturalmente a los ratones de laboratorio: MVM y el parvovirus del ratón (MPV, del inglés *mouse parvovirus*,) (Crawford, 1966; Ball-Goodrich y Johnson, 1994; Besselsen y col., 2006).

El MVM fue reconocido por Hartley y Rowe (1960) como un contaminante en una reserva de adenovirus de ratón, luego fue descrito por Crawford (1966) y caracterizado por Crawford y col. (1969). Posteriormente el virus fue identificado como causante de infección en colonias de ratones (Parker y col., 1970), y como uno de los contaminantes más comunes de las reservas de virus de leucemia en ratón y de tumores trasplantables (Collins y Parker, 1972). En un comienzo, la cepa prototipo denominada MVMp (derivada por clonado de la cepa original Crawford 66 y posteriormente renombrada) y la cepa inmunosupresora designada MVMi, fueron las más estudiadas, la primera de ellas con tropismo por fibroblastos y la segunda con tropismo por linfocitos (Ward y Tattersall, 1982; Tattersall y Cotmore, 1986). Durante el año 1981, en los ensayos de inmunofluorescencia para los que se utilizaba la partícula viral completa como antígeno, se identificaba que en algunas colonias se encontraban sueros que eran positivos y al utilizarlos en ensayos confirmatorios como la inhibición de la hemoaglutinación eran negativos, revelándose de esta manera que existían otras especies además del MVM. Las colonias de roedores en las cuales estos modelos serológicos fueron observados pasaron a ser consideradas como infectadas con los denominados parvovirus huérfanos de ratones (MOPV, del inglés *mouse orphan parvovirus*) y el uso de la palabra “huérfano” indicaba la ausencia de signos clínicos en los animales y la imposibilidad de identificar el agente etiológico definitivo (Besselsen y col., 2008). Después de varias tentativas de aislamiento de los virus, Mickisic y col. (1993) en forma azarosa pudieron aislar MPV de tipo 1 luego de cultivar esplenocitos irradiados y mezclar con el sobrenadante de un cultivo de linfocitos

de línea celular de linfocito T CD8 citolítico. Los autores observaron un efecto citopático y aglutinación de eritrocitos en algunos cultivos de células L3, sospechosas de contaminación por virus. Posteriormente por análisis serológicos y moleculares se confirmó la presencia este parvovirus distinto de MVM y fue denominado MPV-1. Este hallazgo inició las investigaciones de caracterización molecular y de patogénesis del MPV-1 como así también el desarrollo de técnicas de diagnóstico específicas para este virus. Las investigaciones demostraron que la región del genoma que codifica a las proteínas no estructurales NS-1 y NS-2 era altamente conservada entre todos los parvovirus de roedores, explicando esto la observación de reacción cruzada en los estudios serológicos cuando eran utilizadas partículas completas en los antígenos de diagnóstico, mientras que las proteínas de la capsida viral VP-1 y VP-2 son virus específicas y son las que permiten realizar la diferenciación serológica entre MVM y MPV (Parker y col., 1970; Ball-Goodrich y Johnson, 1994; Besselsen y col., 1996; Besselsen y col., 2008).

Actualmente son descritos el MVMCR (la cepa original de Crawford -1966-), MVMp (cepa prototipo obtenida por purificación en placa de MVMCR), MVMi (variante inmunosupresora descubierta en 1976), MVMc (cortador) aislada durante la década de 1980 como contaminante de células BHK-21 que eran utilizadas para producir una proteína recombinante en un laboratorio comercial y MVMm (Missouri), aislado de ratones NOD homocigotas infectados de la Universidad de Missouri (Bonnard y col., 1976; Engers y col., 1981; Tattersall y Cotmore, 1986; Besselsen y col., 1996).

En conclusión, desde el descubrimiento de MVM a la actualidad, solo dos cepas han sido estudiadas extensamente, el MVM(p) y el MVM(i) y mientras que MVM(c) y MVM(m) no han generado interés en la investigación debido a que presentan las mismas características que MVM(p) (McMaster y col., 1981; Spalholz y Tattersall, 1983; Tattersall y Bratton, 1983; Naugler y col., 2001).

2.2 Características estructurales y propiedades físico químicas.

El MVM, posee un tamaño de 20 nm, el genoma es de ADN monocatenario de aproximadamente 5.5 kb y, en la mayoría de los viriones, es exclusivamente de polaridad negativa. En cada extremo de la cadena de ADN se encuentra una secuencia corta de bases complementarias que forman una estructura secundaria de importancia para la replicación. La cápside es de simetría icosaédrica y está compuesta por VP1 (~10%) y VP2 (~90%). La proteína dominante VP2 muchas veces se escinde durante la entrada del virus en la célula huésped y elimina aproximadamente 20 residuos aminoacídicos de su extremo N terminal para generar la proteína proteínas VP3. Las proteínas de la cápside forman una estructura robusta con protuberancias superficiales y un poro central en cada uno de los vértices del icosaedro. Esta estructura y la ausencia de envoltura hacen que el MVM al igual que el resto de los parvovirus sea extraordinariamente resistente a las condiciones ambientales. El virus es inactivado después de someterlo a 100°C por 15 minutos, 80°C por 2 horas o 40°C en un máximo de 60 días. También es resistente a la desecación, al pH entre 2 y 11, al cloroformo, éter y al alcohol (Toolan, 1990; Tattersall y Cotmore 1986, Antonietti y col, 1998).

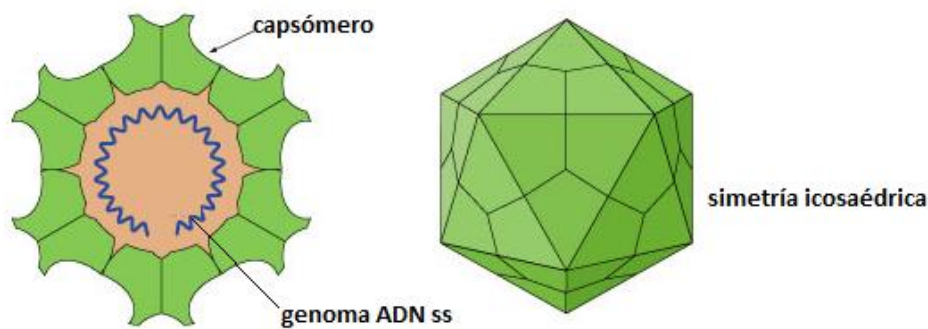


Figura 2. Representación esquemática de un parvovirus. (Tomado de Viral Zone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

2.3 Replicación viral.

La replicación viral ocurre en el núcleo celular y requiere que la célula hospedadora se encuentre en fase S del ciclo de división celular. Esto se debe a que el virus posee un genoma pequeño y por lo tanto una limitada capacidad de codificación, por lo que no produce las enzimas necesarias para la replicación de su propio ADN y necesita utilizar la maquinaria enzimática de la célula hospedadora.

El virus utiliza la fracción del ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular como receptor, e ingresa a célula por el mecanismo de endocitosis. Una vez en el citoplasma se libera del endosoma, se asocia con microtúbulos y es transportado al poro nuclear, por donde ingresa al núcleo. Las secuencias palindrómicas terminales del genoma viral, permiten que se formen estructuras de doble hebra en los extremos y a partir de uno de ellos la ADN polimerasa celular genera ADN de doble cadena. Dicho ADN se utiliza como molde para la transcripción de los ARNm y para la replicación del ADN. El ARNm posteriormente sufre el mecanismo de “splicing” y se traduce en las cuatro proteínas principales (las dos no estructurales – NS1 y NS2- y las dos

estructurales –VP1 y VP2-) y en proteínas pequeñas adicionales. Las proteínas VP1 y VP2 forman las procápsides que se ensamblan con una copia del genoma del virus, constituyéndose así las partículas virales maduras que se eliminan por lisis celular (Carter y Saunders, 2007).

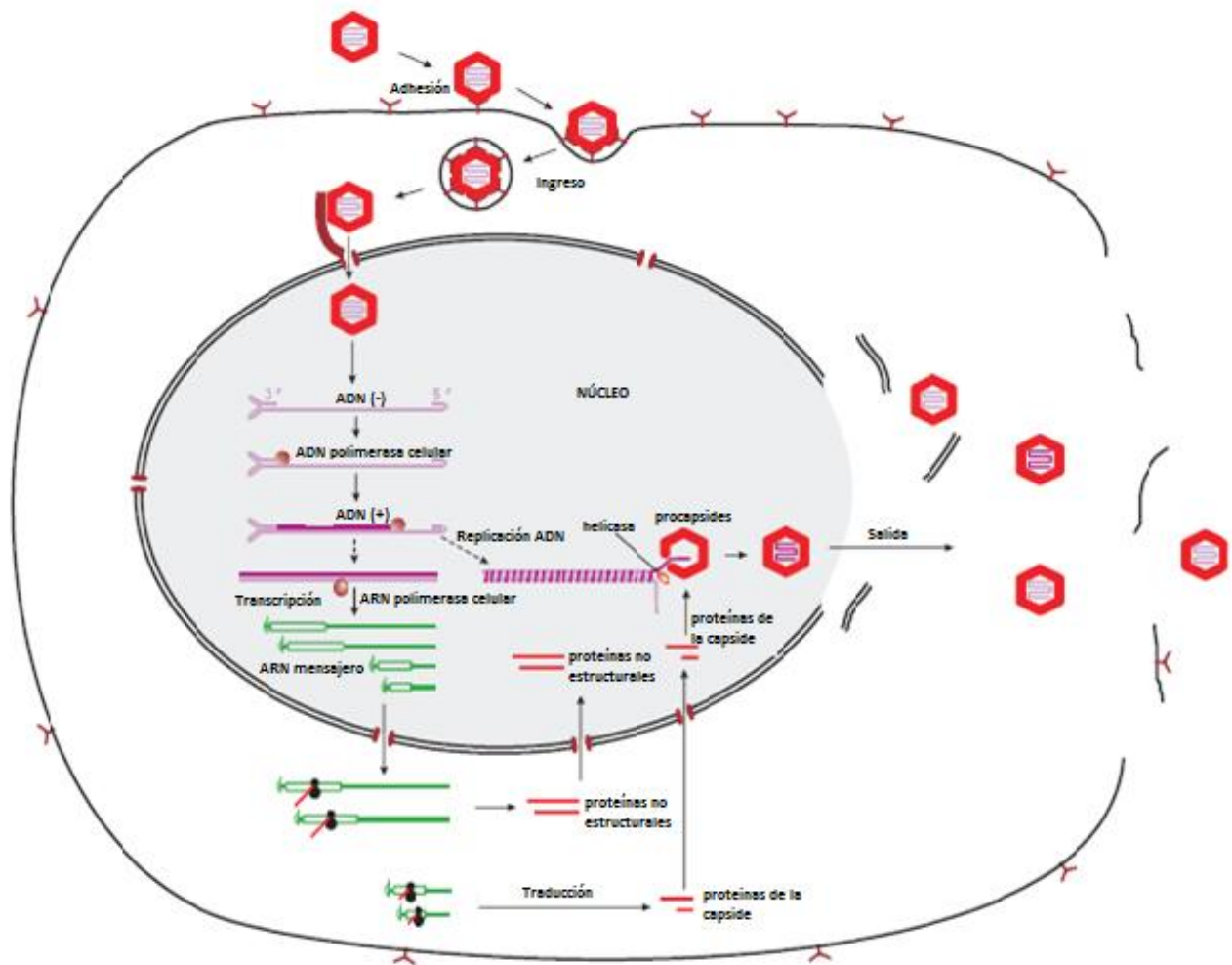


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación de un parvovirus (Modificado de Carter y Saunders, 2007).

2.4 Epizootiología de MVM.

La evidencia señala que MVM es exclusivamente un virus que infecta en forma natural a los ratones, aunque puede ser transmitido fácilmente a hámsters y

ratas a través de una inoculación experimental pudiendo causar en las ratas una infección subclínica, mientras que en hámsters recién nacidos produce una enfermedad letal inducida, involucrando una replicación extensa del virus en varios tejidos (Parker y col., 1970, Smith y col., 1993). Algunos autores demostraron que la transmisión de MVM entre animales infectados y susceptibles ocurre en forma horizontal principalmente y puede producirse por contacto directo o por contacto nasal-oral, como también por contaminación urinaria o fecal, fómites, comida contaminada y el lecho de la cama sucia. Se demostró que los aerosoles no son importantes en la transmisión (Cross y Parker, 1971).

En 1978 un estudio reportó que posteriormente a la inoculación intraperitoneal de un cultivo celular infectado con MVM, el virus no fue excretado en orina o heces y no se transmitió a animales sanos susceptibles mantenidos en estrecho contacto con ratones infectados con el virus (Parker y col, 1978). Sin embargo, un estudio posterior de Smith (1986) demostró la transmisión eficiente de MVM entre animales alojados en la misma caja bajo condiciones similares. El reporte de Parker (1978) no contenía suficientes detalles de sus infecciones experimentales con MVM para identificar los fundamentos probables de esta discrepancia y no estaban bien detallados factores como la dosis inicial de infección del virus y las cepas de ratones utilizadas que podrían afectar la capacidad de virus inoculado a ser transmitido.

La infección transplacentaria del feto en desarrollo, fue demostrada por infección experimental para MVM y otros parvovirus en varias especies de roedores, por ende también la transmisión vertical es una posibilidad de propagación de virus en las colonias (Kilham y Margolis, 1995). En experiencias posteriores se demostró que los embriones de ratón con la zona pelúsida intacta no son susceptibles a la infección por MVM, sin embargo, se encontró la infección de embriones con MVM y MPV en experiencias de transferencia embrionaria de rutina. Esto sugiere que en la técnica de transferencia embrionaria utilizada para la limpieza de colonias contaminadas, podrían existir alteraciones en la zona pelúsida de los embriones y los mismos se infectarían con parvovirus (Mohanty y Bachmann, 1994).

Se ha demostrado que la sensibilidad de infección por MVM es genotipo y en algunas cepas también género dependiente y se han citado casos de sensibilidad y seroconversión con a MVM en tres fenotipos diferentes de ratones, por ejemplo ratones C57BL/6N, FVB/N (endocriados) y NMRI (exocriados) son resistentes a la infección, requiriendo dosis infectivas del orden de 10 a 100 veces mayores comparadas con las necesarias para infectar a ratones de las cepas BALB/c o CD1 (Besselsen y col., 2000; Shek y col., 2005). También se demostró que en neonatos de la cepa DBA/2 este virus genera una hemorragia intestinal letal al igual que en la BALB/c y en la C3H (Brownstein y col., 1991). Otros autores también afirman que algunas cepas de ratones heterogénicas e isogénicas como ser SW, ICR, BALB /c y C3H son más susceptibles a la infección por MVM (Jacoby y col, 1995; Jacoby y col., 1996).

Los anticuerpos (Ac) maternos de madres no infectadas durante la gestación, protegen a los neonatos durante el período de lactancia hasta 6 a 8 semanas de edad, pero la mayoría de los ratones nacidos en colonias infectadas se infectan luego a los dos o tres meses de edad.

El MVM causa una enfermedad aguda y autolimitante a diferencia del MPV que puede causar una infección persistente en ratones jóvenes y adultos y siendo el virus eliminado de forma intermitente durante más de seis semanas (Smith y col., 1993; Jacoby y col., 1996). La inmunidad pasiva declina alrededor de las cuatro semanas y los ratones jóvenes son más propensos a contraer la infección por MVM en comparación con los adultos, además no se produce protección cruzada de inmunidad humoral para MVM o MPV. Los animales infectados con MVM eliminan el virus por períodos relativamente largos y de forma transitoria. De acuerdo con Smith (1983) y Jacoby y col. (1991), MVM puede ser eliminado durante cuatro semanas. Bauer y Riley (2006) detectaron la eliminación de MVM a través de las heces por la técnica de PCR en muestras de ratones provenientes de una colonia infectada naturalmente y en el 70% de los ratones controlados mostraron que MVM era detectado en los animales a partir de las 5 semanas de edad y declinaba progresivamente hasta llegar a la 13 semana de edad, período en el cual todos los animales fueron negativos para el virus. Los porcentajes más

altos de los animales positivos para MVM (70% a 60%) se observaron cuando estos eran de 6 a 9 semanas de edad. Parker y col. (1978) analizaron la historia natural de las infecciones MVM enzooticas en tres colonias de ratones en bioterios, examinando la presencia de Ac en función de la edad del animal. En las primeras seis a ocho semanas de vida, el número de animales seropositivos disminuyó de 60% al 20%. En cada colonia, un fuerte aumento fue notado entre 8 y 12 semanas momento en el cual más del 90% de los animales en cada colonia se habían vuelto seropositivos. Esta alta frecuencia de animales con Ac se encontró hasta las 40 semanas de edad. Estos datos implican que los ratones jóvenes están protegidos en las primeras semanas de vida por los Ac de la madre. Cuando esta protección pasiva disminuye para el final del primer mes, los animales se vuelven susceptibles y son infectados con el virus.

2.5 Patogénesis de MVM.

MVM es capaz de establecer una infección enzoótica en colonias de laboratorio, siendo asintomática la infección en animales adultos inmunocompetentes y en ausencia de manipulación experimental. No hay, por lo tanto, procedimientos fiables de inspección externa para un diagnóstico clínico o morfológico de infección por MVM (Brownstein y col., 1991; Kimsey y col., 1986; Segovia y col., 1999).

Desde el punto de vista de la ciencia que estudia la biología evolutiva, el hecho de que las infecciones naturales por parvovirus en roedores sean predominantemente asintomáticas, sugiere que las relaciones entre estos virus y sus huéspedes naturales son antiguas y evolucionadas (Lamana y col., 2001).

La infección por MVMp en ratones adultos es restringida al tracto intestinal y se han citado esplenomegalias en inoculaciones experimentales; mientras que MVMi produce infección sistémica con necrosis renal papilar y alteraciones hematopoyéticas (Berns, 1984).

Numerosos estudios sobre la patogenia de MVM han demostrado que, en general, causan anormalidades fetales y neonatales, destruyendo poblaciones

específicas de células que proliferan rápidamente durante el curso normal del desarrollo (Kilham y Margolis, 1966). En los animales adultos esto no ocurre, ya que son resistentes porque los tejidos están mitóticamente inactivos y en consecuencia no hay una enfermedad manifiesta. Un estudio asociado a una infección de origen natural con MVM produjo retraso del crecimiento, reducción de la fecundidad y muerte prematura en ratones NOD homocigotos para una mutación dirigida de la cadena pesada de inmunoglobulina (Naugler y col., 2001).

Ratones deficientes en linfocitos B (Igh-6^{-/-}) naturalmente infectados con MVM mostraron un síndrome de enanismo, fecundidad reducida prematura, anemia y leucopenia, indicando que MVM había infectado células progenitoras hematopoyéticas en el bazo y la médula ósea (Janus y Bleich, 2012). Los ratones inmunodeprimidos son particularmente sensibles a la infección de MVM en los primeros días de vida (Toolan, 1960).

En las infecciones causadas por MVM en ratones adultos, encontramos que pueden estar restringidas al tracto entérico sin lesiones excepto en animales inmunodeprimidos, o producir efectos inmunomoduladores por una inducción débil de interferón *in vivo* (Harris y col. 1974) y de IFN-beta, TNF-alfa e IL6 *in vitro* (Schlehofer y col., 1992). También puede producirse una infección sistémica en neonatos asociada con necrosis papilar renal y la interrupción hematopoyética (Brownstein y col., 1991; Kimsey y col., 1986; Segovia y col., 1999, Shek, 2003).

En infecciones experimentales con MVMi en los neonatos de C57BL/6 se observa que son muy resistentes a la infección letal, mientras que neonatos de las cepas BALB / c, SWR, SJL, CBA y C3H desarrollan infarto renal con sangrado papilar. La cepa C3H también puede presentar sangrado intestinal y acelerar la involución de la hematopoyesis hepática (Jacoby y col., 1996).

Otra característica de la infección por MVM en forma experimental en ratones neonatos es la hipoplasia cerebelar (Kilham, 1971) que con frecuencia conduce a una ataxia crónica. De esta manera, se demostró que esta condición era a causa de un agotamiento de origen viral en una población de células que está proliferando rápidamente y en este caso, en células de la corteza granular del cerebelo. Posteriormente se demostró que estas lesiones características ocurren

en infecciones naturales por MVM en ratones durante el período prenatal mostrando también hipoplasia cerebelar y ataxia debido a la acción viral selectiva con rápida proliferación de la capa germinal externa del cerebelo. El endotelio vascular y sistemas hematopoyéticos y linforreticulares (que comprenden diferentes tipos de células) que proliferan y se diferencian en el adulto y en el recién nacido, son por lo tanto blancos comunes de MVM y las lesiones y signos clínicos de la enfermedad se deben a la infección de esos tejidos (Cotmore y Tattersall, 1986; Toolan, 1983).

Así como sucede en los ratones recién nacidos, también aquellos que se infectan en el útero son susceptibles a la enfermedad, ya que poseen un gran número de células en división para la replicación del virus debido a que MVM traspasa la placenta y establece infecciones del feto. Un número de factores afectan el resultado de infecciones fetales experimentales, tales como la ruta de inoculación, dosis y cepa viral, la especie huésped preñada y los ratones infectados durante la gestación. En algunos casos, la inoculación temprana con una gran dosis de MVM durante la gestación, dará lugar a una infección letal en forma generalizada y devastadora, con una participación de gran parte del tejido mesodérmico del embrión que resulta en una reabsorción o momificación fetal (Brownstein y col., 1991). La infección en tiempos finales de la gestación puede producir descendencia viable pero además del desarrollo de una hipoplasia cerebelar mencionada anteriormente, se puede también desarrollar una encefalopatía hemorrágica o enteritis y hepatitis neonatal. Además, la participación de poblaciones de células con alta actividad mitótica durante o después de la infección es una característica consistente de estas enfermedades (Kilham y Margolis, 1995; Jacoby y col., 2001).

Por lo tanto, en las infecciones experimentales se observa que tanto el genotipo del ratón huésped, la dosis viral y la vía de inoculación, afectan el curso de una infección exitosa como también el desarrollo de una enfermedad en el caso que el virus alcanzara al feto en desarrollo (Jacoby y col., 2001). Los efectos del tiempo de infección por MVM durante la gestación sugieren que diferentes tipos de células en diferentes tejidos embrionarios pasan por un estado de sensibilidad y

están secuencialmente y transitoriamente “en riesgo” durante el desarrollo fetal. Este “periodo de riesgo” se corresponde con el tiempo de proliferación rápida de determinado tipo celular durante el proceso de organogénesis. El requerimiento de la transición Fase-S celular para la infección productiva mencionada anteriormente ha sido propuesto como base para el tropismo del tejido específico observado durante la infección por MVM y para explicar la resistencia de un animal adulto en comparación con el feto o neonato. En los roedores neonatos murinos se demostró que son incapaces de recuperarse de una infección por MVM debido a la inmadurez de su sistema inmune como consecuencia del virus (Shek, 2003). Una infección prenatal puede causar la pérdida parcial o completa de la camada debido a la necrosis de los tejidos linfáticos, hematopoyéticos y trombocitopenia, mientras que los progenitores permanecen aparentemente normales (Jacoby y col., 1996; Gaertner y col., 1996; Jacoby y col., 2001).

Aunque la actividad proliferativa celular parece ser un pre-requisito para órganos diana, está claro que no todos los tejidos que crecen rápidamente, están necesariamente sujetos a una infección por MVM. La mayoría de los tejidos en un adulto están mitóticamente inactivos en comparación con los del feto o neonato, pero varios tejidos como el epitelio intestinal y el sistema hematopoyético que contienen grandes números de células en una activa mitosis es de esperar que estas células, las cuales son esenciales para la supervivencia y el bienestar del organismo huésped, sean el blanco del ataque del parvovirus en el adulto que le permiten mantenerse en la colonia en forma latente o en ausencia de lesiones. En la actualidad no existen estudios suficientes en animales transgénicos y que son utilizados en gran número en investigación que pueden ser susceptibles de infecciones a MVM (Jacoby y col., 1995), sin embargo en ratones SCID adultos con inmunodeficiencia combinada grave, produce un agotamiento de los precursores hematopoyéticos en la médula ósea, que conduce a leucopenia grave y la eritropoyesis acelerada (Segovia y col., 1999), que afecta la repoblación, de células madre hematopoyéticas a largo plazo (Segovia y col., 1991; 2003).

Estudios in vitro proporcionan evidencia para las variaciones de la cepa de MVM en el genotipo animal, tropismo tisular y el potencial de cambios a ocurrir por

mutación en el rango de los diferentes tipos de células que una determinada cepa viral puede infectar. Por lo tanto, una simple explicación de la posible aparición de cepas de virus patogénicas para un huésped adulto transgénico o no, es que dichos virus han mutado para incluir, dentro de su repertorio de los tipos de células productivas, a algunas que proliferan rápidamente en el animal maduro, pero también se podría predecir que la presión evolutiva hacia un estilo de vida enzoótico y de aislamiento en poblaciones de hacinamiento, tales como son los bioterios con colonias de roedores de laboratorio, pueden llevar a la eliminación del repertorio de las cepas comunes estudiadas de los parvovirus de roedores (Gardiner y Tattersall, 1988, Segovia y col., 1999).

Estudios in vitro sobre la especificidad de la célula diana han proporcionado significativo apoyo para la hipótesis de que el crecimiento del virus lítico se modula por componentes regulados por el desarrollo realizado en el huésped a un nivel celular (Garnick, 1996). Mohanty y Bachman (1974) han reportado que las células activamente en división de un embrión temprano de ratón son resistentes a la lesión y muerte por MVM. Células de carcinoma embrionario murino y las células madre de teratocarcinoma son también resistentes a MVM al igual que muchos de sus diferentes derivados celulares. Sin embargo, cuando estas células son inducidas a diferenciarse in vitro, dan lugar al menos a un tipo de célula diferenciada, parecida a un fibroblasto, el cual permite la replicación productiva de MVM. Estos estudios demostraron que el ciclo celular, aunque es necesario, no es suficiente para la replicación lítica, productiva de los parvovirus, y que el tipo y estado de diferenciación celular de la célula huésped es de suprema importancia (Jacoby y col., 1995).

2.6 Asociación de tumor y oncosupresión por MVM.

Los aislamientos sucesivos de MVM en tumores o animales tratados con carcinógenos muestra que este virus podrían tener alguna asociación causal con las enfermedades neoplásicas. Sin embargo, muchos estudios sobre la influencia a largo plazo de la infección de MVM sobre un animal huésped, han demostrado

una conclusión opuesta. Es decir que MVM interfiere y en algunos casos suprime la formación de tumor en sus huéspedes. Esta notable propiedad y característica es de obvia preocupación cuando la introducción involuntaria del virus ocurre en una investigación relacionada al cáncer tanto en sistemas de animales como de cultivo de células. (Kilham, 1969). La mayoría de los estudios en animales ha revelado que MVM y otros parvovirus exponen un comportamiento oncosupresivo y no un desarrollo de tumores (Ball-Goodrich y col., 1998).

Dilucidar el mecanismo por el cual MVM suprime la inducción del tumor en todos los sistemas del animal es complicado. Un enfoque más factible sería estudiar in vitro análogos en el que los efectos de la replicación del virus sobre el proceso de transformación celular podrían ser examinados en ausencia de los principales factores extrínsecos tales como las respuestas hormonales e inmunes del animal huésped (Linser y col., 1977). Legrand y colaboradores (1992) describieron un sistema in vitro usando MVM y el virus del simio (SV40 Poliomavirus), el cual promete ser de gran valor en el estudio de las interacciones parvovirus-oncogen, y el cual ilustra los tipos de interferencia potencial ejercida por este virus en estudios de transformación de células in vitro. Ellos describen el aislamiento de una variante de fibroblasto de ratón BALB/c que es resistente a la muerte de la célula por MVM gracias a un bloqueo intracelular de la replicación viral. En esta línea celular mutante se puede realizar una coinfección o superinfección con MVM que reduce drásticamente la capacidad del virus SV40 a transformar con éxito a las células. Además, ellos demostraron que estas células mutantes, una vez transformadas por SV40 en la ausencia de MVM, eran ahora capaces de apoyar una infección productiva con MVM. Esto implica, ya sea que un producto del gen temprano SV40 puede directamente complementar el defecto celular para la replicación MVM, o que la transformación ha activado o reactivado un gen celular cuyo producto no se encuentra en el mutante y es requerido para el crecimiento de MVM. Un rol potencial para un gen transformante en la replicación del parvovirus puede por lo tanto ahora ser estudiado in vitro, y es de esperar que dichos estudios puedan revelar el mecanismo por el cual la supresión del tumor ocurre en todo el animal (Mähler y Kohl, 2009). Aparte de los atributos

inmunomoduladores y mielosupresores que podrían impedir la investigación basada en la utilización de roedores, MVM se valora como una excelente herramienta para la viroterapia en cáncer gracias a su fuerte potencial oncosupresor natural y baja patogenicidad en los seres humanos (Rommelaere y Cornelis, 1999).

La terapia anticancerosa basada en virus implica el uso de los mismos ya sea como agentes oncolíticos de replicación o como vectores recombinantes para la transferencia génica. Las propiedades oncotropicas y oncotóxicas de MVM permiten ambos tipos de aplicaciones y sirven para los propósitos de la terapia génica del cáncer. MVM suprimió los tumores de la ascitis de Ehrlich (EA) en ratones; la co-inyección de células EA y MVM dio como resultado una pronunciada inhibición de la formación de tumores EA. Además, los ratones que sobrevivieron a la co-inyección de EA-MVM adquirieron resistencia a largo plazo a la inyección adicional de células EA (Guetta y Graziani, 1986). En otro ensayo usando un vector MVMP que transducía la quimioquina IP-10, se suprimió un hemangiosarcoma metastásico en ratones inmunocompetentes (Giese y col, 2002). En estudios de aplicaciones antitumorales en medicina humana más actuales por parvovirus, la investigación está focalizada en estudiar la dinámica evolutiva de enfermedades causadas por parvovirus y las interacciones virus-huésped implicadas en el oncotropismo de estos virus. Ambas estrategias están destinadas finalmente al desarrollo de herramientas biológicas anti-cáncer seguras siendo el modelo antiviral el virus diminuto del ratón (MVM) en infecciones de ratones normales e inmunodeficientes (Riolobos y col, 2010).

2.7 Persistencia, estado latente y activación.

Varios autores han sugerido que una frecuente, o quizás inevitable consecuencia de la infección con MVM es el establecimiento de una infección persistente o latente a largo plazo en los animales. Las colonias de ratones infectadas mantienen niveles considerables de Ac circulantes por largos periodos después de la infección, quizás de por vida (Nicklas y col., 2002, 1993).

Después de la infección experimental los antígenos (Ag) virales pueden detectarse en los tejidos de un animal por técnicas convencionales, durante un período relativamente corto, generalmente por dos semanas, pero los títulos de Ac sostenidos, implican una continua estimulación de bajo nivel del sistema inmune. Esto puede ocurrir en muchas situaciones enzoóticas por sucesivas rondas de reinfección de un ambiente contaminado o colonia contaminada y también puede ser debido a un continuo nivel bajo de producción de virus en el animal huésped. Quizás la evidencia más convincente de la persistencia de MVM es la demostración de que el virus infeccioso puede ser aislado de los tejidos en animales con títulos de Ac importantes como también en experiencias de aislamiento exitoso de MVM en tejidos de animales sin Ac detectables para dicho virus y de colonias enzoóticamente infectadas. Esto implica que es un agente totalmente transmisible, y que los animales están sujetos a una continua reinfección mencionada anteriormente (Kapil, 1995). Parker y col. (1978) usaron el test de producción de anticuerpos de ratón (MAP) para demostrar directamente la presencia de MVM en extractos de bazo y sangre de ratones adultos. Los intentos de recuperar el virus en ratones de menos de 35 días de edad no tuvieron éxito, independientemente del estado inmune de estos ratones. Sin embargo, el virus pudo ser aislado con una frecuencia alta de los bazos de animales de 40 a 45 días de edad de la misma colonia, aún cuando la mayoría de estos tenían títulos IHA entre 1:80 y 1:320. Recientemente, se detectó ADN de MVM en bazos a las 16 semanas después de la exposición en algunas cepas de ratón (estos animales estaban libres de patógenos murinos comunes), lo que indica que MVM podría de hecho causar infecciones persistentes (Janus y col, 2008). La noción de que MVM persiste en tejidos linfoides de ratones inmunocompetentes, a pesar del inicio de la inmunidad del huésped, se confirmó recientemente (Janus y col, 2010).

Entonces aunque la evidencia antes citada sugiere que las infecciones con MVM pueden persistir en todo animal o colonia, no hay informes en la literatura en los cuales se establezca la persistencia como un fenómeno experimentalmente reproducible. No hubo demostraciones de estado latente de MVM como se evidencia, por ejemplo, por la presencia de genomas virales intracelulares y la

ausencia de partículas de virus infeccioso. Sin embargo, a pesar de la falta de pruebas definitivas a favor o en contra, se puede mencionar que existe una gran probabilidad que ambos, ya sea la persistencia y el estado latente sean parte del proceso infeccioso de MVM. Quizás el aspecto más importante del estado latente potencial es la capacidad de poder realizar una manipulación experimental para activar la infección del virus como puede ser a través de inmunosupresión e inducción de tumores (o tratamiento carcinógeno) para la activación de virus latente. Pero si la inmunosupresión y tumorigénesis tienen alguna característica común que conduce a facilitar el aislamiento del virus en animales tratados, no se conoce aún (Corning Pritchett y col., 2009).

2.8 Prevalencia.

Actualmente MVM y MPV del ratón son algunos de los agentes infecciosos más comunes detectados en colonias de ratones de laboratorio. Estudios actuales demostraron que la prevalencia de MVM varía dependiendo del estudio y técnica utilizada. Aproximadamente el 1 al 3% de las muestras enviadas por instituciones de investigación en USA y Europa del Este son positivas para

MVM y en Europa del Oeste en los años 80 era del 2% mientras que en esta década se reportaron prevalencias mayores a 8,8% (Janus y Bleich, 2012) y siendo con frecuencia de aparición conjunta con MPV (Livingston y Riley, 2003).

La prevalencia de ambos virus se observa tanto en bioterios convencionales, así como en aquellos en los cuales los animales son mantenidos bajo estrictos sistemas de barreras de protección y con importantes programas de vigilancia de la salud (Jacoby y col., 1996; Janus y col., 2008; Clifford y Watson, 2008; Besselsen y col., 2008). Los estudios con datos de prevalencia de estos parvovirus en colonias convencionales y controladas, de ratones utilizados en experimentación provenientes de instituciones y fuentes de investigación comercial, son reportados en los EUA (Casebolt y col., 1988; Jacoby y Lindsey, 1997; Livingston y Riley, 2003), en Canadá (Descoteaux y col.1977; Lussier y Descoteaux, 1986), en Europa (Carthew y col., 1978. Y Carthew Verstraete, 1978;

Gannon y Carthew, 1980; Zener y Regnault, 2000; Schoondermark-van de Ven y Logt, 2006), Australia (Filipovska-Naumovska y col., 2010), Taiwán (Liang y col., 2009), y Japón (Ueno y col., 1998; Goto y col., 2009). En Brasil, Gilioli y col., (1996) y Gilioli (2003) evaluaron colonias de ratones y ratas de 18 bioterios e informaron una prevalencia de 47,1% en colonias de ratones. En Argentina los primeros registros se detallan desde los años 2007 al 2010 cuando según datos experimentales iniciales de Laborde y colaboradores en un estudio se controlaron 616 sueros de ratones provenientes de instituciones estatales y privadas de Buenos Aires y conurbano y se obtuvieron resultados de 15,38 %, 22,84 %, 17,78 % y 29,89 % respectivamente para cada año y un promedio general de 21,92 %.

MVM es también un contaminante común en reservas de virus de leucemia de ratones y tumores trasplantables. Los estudios se iniciaron en la década del 70 y se encontró que 79 (40%) de 195 muestras reserva de leucemias de ratón y tumores trasplantables estaban contaminados (Parker y col., 1970). Luego Collins y Parker (1972) demostraron que el MVM había contaminado 151 (32%) de 465 reservas de muestras de virus de leucemia del ratón y tumores trasplantables. En este último estudio se determinó que MVM ocupaba el segundo lugar después del virus elevador de lactato deshidrogenasa (LDEV) en la ocurrencia como un contaminante viral.

Es importante destacar que la prevalencia de algunas especies de parvovirus de roedores reportados en varios continentes durante las últimas décadas ha sido difícil de evaluar debido a la utilización de Ag genéricos en las pruebas serológicas. Existe la posibilidad de que MPV ha contribuido a seroconversiones asignadas históricamente a MVM (Jacoby y Gaertner, 2006). MVM presenta una alta prevalencia en colonias de ratones enzoóticamente infectadas y bajas tasas de prevalencia en colonias controladas, indicando persistencia y difícil erradicación. Parker y col., (1970) y Nicklas y col., (1993) atribuyeron la infección persistente de MVM por el uso de material biológico contaminado en la inoculación de los animales. Clifford y Watson (2008) informan que las principales razones de la dificultad en la erradicación de este virus son varias: la permanencia en el ambiente por mucho tiempo debido a su resistencia a

la desecación e inactivación por los desinfectantes comunes utilizados; su fácil transmisión entre bioterios de producción y la excreción por largos períodos por los animales infectados (Besselsen y col., 2000; Shek, 2005).

2.9 Diagnóstico serológico.

Los métodos serológicos son los más utilizados para la inspección de salud de rutina. Hasta la década de 1980, las pruebas serológicas como ELISA e IFI que utilizaban viriones o células infectadas como Ag genéricos eran utilizadas para la detección de MVM. La prueba de IHA también es utilizada para distinguir las infecciones por MVM y por MPV (Shek, 2003; Jacoby y Gaertner, 2006).

Los tumores trasplantables y otros materiales biológicos de ratones pueden ser examinados por el test MAP (Jacoby y col., 1979) y/o por el aislamiento del virus (Souza y Smith, 1989).

Las técnicas de ELISA e IFI son consideradas las más sensibles (Tattersall y Cotmore, 1986) pero a pesar de ser sensibles, tienen baja especificidad debido a la reacción cruzada con Ac contra las proteínas no estructurales (NS) que son muy conservadas entre las especies de parvovirus. El test de IHA, aunque es muy específico para reconocer los Ac de proteínas estructurales (VP) muy divergentes entre las especies, es poco sensible porque detecta solamente Ac contra la hemaglutinina viral (Kraft y Meyer, 1986; Livingston y col, 2002, Ball-Goodrich y col, 2002).

Después del descubrimiento de MPV (MicKisic y col, 1993; Ball-Goodrich y Johnson, 1994; Besselsen y col., 2006) el diagnóstico de la infección de ratones pasó a depender además de la utilización de varios métodos complementarios, como los métodos moleculares. Por lo tanto, varias pruebas de diagnóstico fueron desarrolladas basadas en serología y PCR (Jacoby y Gaertner, 2006, Brayton y col., 2004; Shek, 2003; Besselsen y col., 2008). El MPV se multiplica relativamente poco en los cultivos e impide la producción a gran escala de Ag para su uso en pruebas serológicas en laboratorios de diagnóstico. Esta dificultad se solucionó con la producción de Ag virales recombinantes para uso en el diagnóstico

serológico (Besselsen y col., 2008). El primero fue un ELISA genérico que detecta infecciones causadas por MVM debido a la región NS-1 que es muy conservada entre especies (Riley y col., 1996; Jacoby y Gaertner, 2006). No obstante es posible observar resultados falso-negativos en algunas situaciones, pues hay evidencia de ensayos donde han demostrado que una respuesta de Ac NS1 puede estar ausente o atrasada frente a una respuesta de Ac a VP (Shek, 2003). Por lo tanto un nuevo ensayo de ELISA ha sido desarrollado para detectar estos virus mediante el uso de antígenos rVP2 de MPV y de otros parvovirus que se expresaron en *E. coli* o células de insecto infectadas con baculovirus (Kunita y col., 2006; Dhawan y col., 2004; Ball-Goodrich y col., 2002; Linvigston y col., 2002). El antígeno rVP2 expresado en *E. coli* parece ser menos selectivo, probablemente porque parte del mismo se desnaturaliza durante el proceso de extracción y purificación (Shek, 2003; Dhawan y col., 2004).

En la actualidad, existen algunos laboratorios de diagnóstico que realizan el procesamiento de muestras de roedores empleando IHA como una técnica complementaria para distinguir infecciones de nuevos parvovirus. Por lo tanto, el diagnóstico de infecciones MPV puede realizarse por exclusión basado en un resultado negativo de IHA usando MVM como Ag junto con un resultado positivo de IFI que utiliza MVM como Ag (Brayton y col., 2004.; Jacoby y Gaertner, 2006). Inmunoensayos fluorescentes multiplex (IMF), implementados recientemente en muchos laboratorios de diagnóstico de animales de experimentación incluyen tanto rNS1 como un panel de Ag rVP2, de modo que el Ag rNS1 se utiliza como indicador "genérico" de la infección por parvovirus de roedores y los Ag rVP2 son utilizados para la diferenciación viral (Besselsen y col., 2008).

Las pruebas serológicas son utilizadas para detectar infecciones endémicas, pero son incapaces de detectar brotes agudos, donde aún no se ha producido la seroconversión (Taylor y Copley, 1994; Besselsen y col., 1995). Además, no se pueden emplear en las muestras de suero provenientes de animales inmunodeficientes y no tienen aplicabilidad en la evaluación de contaminación de material biológico (Wan y col., 2006).

2.10 Diagnóstico por la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Aunque las pruebas serológicas indiquen exposición histórica o contemporánea a los virus, el diagnóstico molecular se puede utilizar para obtener pruebas de infección activa. La PCR para el diagnóstico de MVM y otros parvovirus es bastante sensible y el uso de cebadores cada vez más adecuados han hecho esta técnica bastante específica. El enfoque de la PCR es similar a la serología ya que utiliza secuencias de gen NS1 que son conservadas entre todas las especies de parvovirus de roedores o secuencias de gen VP2 que se conserva entre los aislamientos de cada especie viral. Por lo tanto, las secuencias NS1 son utilizadas como una indicación "genérica" de la infección por parvovirus y las secuencias VP2 se utilizan para la diferenciación viral como ser MVM (Besselsen y col., 2008). Esta técnica parece ser más adecuada para detectar MVM en tejidos de ratones infectados con aproximadamente 8-10 semanas de edad (por ejemplo, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos) (Besselsen y col., 1995; Besselsen, 1998; Redig y Besselsen, 2001; Wan y col., 2006) y en las heces potencialmente infectadas que se encuentran en el lecho de los animales (Ueno y col., 1997; Kunita y col., 2006; Bauer y Riley, 2006). Además, la técnica de PCR se recomienda para la evaluación de animales inmunodeficientes como también en la identificación de MVM en material biológico contaminado, por ejemplo, un cultivo celular o líneas tumorales (Chang y col., 1997; Zhan y col., 2002; Bootz y col., 2003; Blank y col., 2004; Bauer y col., 2004). También puede aplicarse como monitoreo del medio ambiente en racks ventilados, para liberación de animales sospechosos de cuarentena, para la identificación y caracterización de los aislamientos de virus y para la confirmación de los resultados serológicos (Shek, 2003; Besselsen y col., 2006, 2008).

A pesar de la disponibilidad de ensayos de diagnóstico muy sensibles y específicos, la detección de MVM al igual que MPV sigue siendo problemática en las colonias de ratones con bajas tasas de prevalencia de la infección por este virus, porque son requeridos títulos virales altos para inducir la infección productiva e intermitente en ratones destetados y adultos. En este caso, se

recomienda el uso de ratones centinelas (Besselsen y col., 2008; Clifford y Watson, 2008) de preferencia animales BALB/c o Swiss y se debe evitar la cepa C57BL/6N que es relativamente resistente a la infección de MVM y MPV (Besselsen y col., 2000; Pritchett y col., 2006).

2.11 Interferencia en la investigación.

En la ciencia de los animales de laboratorio, las entidades como FELASA (Federación Europea de Asociaciones de Animales de Laboratorio) actualmente han planteado la importancia a establecer listados de patógenos de los que deben estar libres los animales utilizados en experimentación basados en la interferencia sobre las investigaciones y no únicamente en los signos clínicos y patologías que producen las enfermedades ya que existe un número considerable de contaminaciones por patógenos que cursan en forma subclínica o sin manifestaciones aparentes de enfermedad (Fentener Van Vlissingen, 2015). En este contexto MVM a pesar de que en algunas cepas de ratones adultos e inmunocompetentes puede cursar una infección asintomática, se encuentra en la lista patógenos a controlar y debe estar ausente en animales utilizados en experiencia (Besselsen, 2008).

El MVM puede tener efectos nocivos sobre la investigación *in vitro* e *in vivo* debido a efectos inmunomoduladores (Bonnard y col., 1976; Engers y col., 198; Kinsey y col., 1986; McKisic y col., 1996; McMaster y col., 1981), supresión de tumores transplantados (Giese y col., 2000; Guetta y col., 1986; Kimsey y col., 1986; McKisic y col., 1993, 1996) y la contaminación de los cultivos y tejidos procedentes de células de ratones (Bonnard y col., 1976; Collins y Parker, 1972; Crawford y col., 1969; Garnick, 1996, 1998; McKisic y col., 1993; Nicklas y col., 1993).

Este virus pueden infectar un cultivo de células, cultivos de esplenocitos y linfocitos, clones de células T CD8 + y CD4 + estimuladas con IL-2, también produce inhibición de la proliferación, causando muerte celular (McKisic y col., 1993; Wan y col., 2006). MVMi crece líticamente en clones de linfocitos-T

citotóxicos y anula las respuestas de los linfocitos-T citotóxicos, suprime las respuestas mitogénicas de los linfocitos-T y las de los linfocitos-B auxiliar-dependiente-T, in vitro (Bonnard y col., 1976; Engers y col., 1981; Tattersall y Cotmore, 1986).

MPV se encuentra predominante y persistentemente en órganos linfoides, células endoteliales y células de Kupffer (Smith y col., 1993; Shek y col., 1998). En las infecciones crónicas, el MVM altera la respuesta inmune "in vivo", sin embargo los efectos varían en diferentes cepas de ratones y en los tejidos linfoides (Besselsen, 2008).

Está claro que MVM es un contaminante común de reservas de virus de leucemia en ratones, tumores, hibridomas, y otras líneas de células (Parker y col., 1970; Collins y Parjerm 1972; de Souza y Smith, 1989). Así, parece probable en gran medida que los estudios involucrando estos materiales están a veces en peligro debido a la contaminación inadvertida de MVM.

En otras experiencias informaron que la inoculación intramuscular o intraperitoneal de MVM en los ratones suprime el crecimiento de las células de tumor ascítico Ehrlich (Guetta y col., 1986) y un parvovirus serológicamente relacionado con MVM ha sido reportado como un contaminante de suero fetal bovino (Nettleton y Rweyemamu, 1980).

A continuación se detalla un listado resumido de las interferencias producidas por MVM en varias áreas de investigación:

Patología:

- Desarrollo de cuerpos de inclusión intranucleares (Kilham y Margolis 1971).
- Aparición de defectos dentales en los hámsters a los 5 días de edad después de la infección (Baer y Kilham, 1974).

Inmunología:

- Inducción débil de interferón in vivo (Harris y col. 1974) y de IFN-b, TNFa e IL6 in vitro (Schlehofer y col., 1992).
- Observación de fuertes efectos inhibitorios de la variante inmunosupresor (MVMi) en cultivos alogénicos mixtos de linfocitos in vitro (Bonnard y col., 1976).

- Inhibición de la proliferación de linfocitos y la generación de linfocitos T citolíticos con producción de interferón pero no hay actividad, la inhibición de crecimiento y la actividad citolítica de las líneas de células T y la supresión de una respuesta de anticuerpos in vitro (Engers y col., 1981).
- Inhibición de la generación de linfocitos T citolíticos por MVMi (McMaster y col., 1981).
- Reducción de las respuestas mitogénicas de células T y la interferencia con helper dependiente de B y las respuestas de células T in vitro (Tattersall y Cotmore 1986).
- Depresión de las células T del bazo y la estimulación mitogénica de células B in vivo (Tattersall y Cotmore 1986).
- Inhibición de la hematopoyesis in vitro (Segovia y col., 1991, Bueren y col., 1991).
- Disminución de la hematopoyesis en células de bazo y de médula ósea (Segovia y col., 1995).

Fisiología:

- Desarrollo de esplenomegalia en ratones inoculados (Berns, 1986).
- Observación de aplasia cerebelar en ratones neonatos y lactantes (Kilham, 1971).
- Degeneración de la lente y las capas de la retina adyacentes después de la infección en hámsters recién nacidos y una extensa hipertrofia de las glándulas de Harder (Toolan, 1983).

Biología Celular:

- Contaminación de líneas celulares, leucemias y tumores trasplantables (Parker y col., 1970, Collins y Parker 1972, Zoletto 1985, Garnick 1996, Chang y col., 1997).
- Infección persistente de las líneas celulares (Ron & T al 1985, Koering y col., 1996).
- Interrupción de las funciones del nucléolo mediante la replicación del virus en el nucléolo (Walton y col., 1989).
- Interferencia de una proteína del virus (NS1) con la replicación del ADN celular y el ciclo celular se detiene en la fase S (Beeck y Caillet-Fauquet 1997).

- La replicación del ADN viral en los fibroblastos coinfectados con MVM y adenovirus es marcada y depende de la línea celular (Fox y col., 1990).

Teratología:

- Malformación congénita (Margolis y Kilham 1975).
- Muerte y reabsorción de los fetos (Kilham y Margolis 1971, Jordan y Sever 1994).

Infectología:

- Descripción por fue descrito por primera vez del MVM como un contaminante de un depósito de adenovirus ratón (Crawford 1966).

Oncología:

- Contaminación de los tumores trasplantables o inducidos químicamente (Parker y col., 1970, Collins & Parker 1972, Bonnard y col., 1976, 1991 Lussier, Nicklas y col., 1993).
- Inhibición de la transformación celular por SV40 (Mousset y Rommelaere 1982).
- Mayor susceptibilidad de las células transformadas oncogénicas humanas y tumores –derivados de líneas celulares de células de los padres no transformadas y normales (Mousset y col., 1986, Cornelis y col. 1988; Rommelaere y Cornelis 1991).
- Supresión de Ehrlich con ascitis de tumores en ratones luego de la inyección conjunta de MVM y la adquisición de la resistencia a largo plazo a las inyecciones adicionales de células tumorales (Guetta y col., 1986).
- Supresión del crecimiento de mastocitoma P815 en ratones infectados concurrentemente (Kimsey y col., 1986).
- Cooperación de los oncogenes de diferentes clases funcionales en la respuesta de las células al ataque por MVMp (Legrand y col., 1992).
- Cooperación de las proteínas del virus (NS1) con oncogenes lleva en una muerte celular (Mousset y Alabama. 1994).

Está bien documentado que este virus produce interferencias en los ensayos e investigaciones en los cuales se usan ratones. Por lo tanto es importante conocer varios aspectos de la historia natural de infección del MVM y, cuando sea posible, utilizar esa información para predecir escenarios en los cuales

su presencia podría afectar el resultado de un procedimiento experimental debido al potencial significativo del virus a contaminar las instalaciones donde se mantienen los animales bajo experiencia (Harris y col., 1974). También se debe tener cuenta su capacidad para inducir infecciones persistentes en ratones y líneas celulares (Fikrig y Tattersall, 1992 ; Jacoby y col., 1995; Segovia y col., 1999) y las dificultades asociadas que se presentan para la erradicación de este agente de las colonias de ratones de laboratorio infectadas.

Como resultado, las infecciones por parvovirus comprenden uno de los problemas más importantes relacionados con las enfermedades infecciosas encontradas en las instalaciones de investigación con animales de laboratorio contemporáneas.

2.12 Prevención y Control de MVM.

La prevención de una contaminación de las colonias por MVM puede realizarse mediante el control de los factores de riesgo asociados con las probables fuentes de infección, incluyendo roedores salvajes o provenientes de otras instituciones, materiales y suministros, personas y materiales biológicos. Los bioterios deben construirse y mantenerse a fin de evitar la entrada de roedores salvajes y mediante un control de plagas (Jacob y Gaertner, 2006).

En relación a los insumos, las cajas, jaulas, lecho de cama, instrumentos u otros elementos que ha estado en contacto con animales infectados deben ser considerados como medios potenciales de infección y un adecuado procedimiento de esterilización debería ser empleado. Dependiendo de las propiedades físicas del equipo contaminado deberían ser tratadas por medio de autoclave, soluciones con hipoclorito o irradiación UV, en ese orden de preferencia. La esterilización por irradiación con rayos gamma (cobalto 60) no es muy eficaz en la inactivación de MVM. Las superficies externas deben ser desinfectadas con productos químicos oxidantes efectivos para los parvovirus, por ejemplo, hipoclorito de sodio, dióxido de cloro y peróxidos. La asociación de desinfectantes oxidantes con suciedad y materia orgánica genera un biofilm que protege los microorganismos de la acción

de los desinfectantes. Por tanto, es fundamental que las superficies sucias se limpien antes de ser desinfectadas con el fin de reducir la demanda química y asegurar que los microorganismos sean expuestos adecuadamente al desinfectante (Shek, 2003). También se debe tener en cuenta las posibilidades de la transmisión física del virus por vectores humanos, tales como técnicos e investigadores moviéndose entre colonias enzooticamente infectadas, colonias de estado desconocido o en el área limpia. Deben implementarse precauciones adecuadas también durante la manipulación de los animales, tales como el uso y la frecuencia de cambio de los guantes descartables (Rehg y Toth, 1998).

El mantenimiento de los ratones libres de MVM puede ser difícil porque el virus es altamente contagioso. La infección puede establecerse en una colonia a través de la introducción de ratones contaminados, tumores trasplantables contaminados, reservas de virus, y otros materiales biológicos que se utilizan en experiencias con ratones infectados con MVM. Todos esos materiales deberían ser monitoreados para MVM y otros agentes infecciosos antes de la admisión a una instalación (Rowe y col., 1959; Parker y col., 1970; de Souza y Smith, 1989).

La técnica molecular de la PCR si bien es una metodología más costosa, surge como una alternativa eficiente para discriminar todos los posibles parvovirus que contaminan las colonias y materiales biológicos (Compton y Riley, 2001).

Cuando se detecta una contaminación por MVM la manera más eficaz para erradicar la infección de los bioterios es mediante la eliminación de colonias contaminadas y repoblación con animales SPF (Kilham, 1971). Inicialmente se realizaron intentos para que MVM pueda ser eliminado de las colonias de ratones utilizando derivación por histerectomía, pero luego de experiencias negativas, la eliminación de ratones infectados seguida por el reemplazo con ratones libres de MVM es la opción a elección. La transferencia de embriones (de aparición posterior a la histerectomía) no se aconseja ya que se ha demostrado que los embriones pueden portar MVM y MPV en la zona pelúsida (Mohanty y Bachmann, 1994).

Antes de la repoblación se deben realizar los procedimientos de desinfección apropiados. Es de destacar que es contraproducente despoblar y

comenzar una nueva colonia SPF sin antes investigar las fuentes de infección y hacer las modificaciones necesarias en las instalaciones y protocolos de rutinas, funcionamiento y manejo del bioterio de animales, para evitar recurrencia (Shek, 2003; Brayton y col, 2004; Jacob y Gaertner, 2006).

2.13 Investigación futura.

Aun queda mucho para aprender sobre la historia natural de la infección de MVM. Todavía no existe evidencia definitiva sobre la persistencia del MVM en estado latente, aunque hay evidencia que sugiere que dicho estado pueda existir al igual que para otros parvovirus. Aún faltan detalles sobre el mecanismo por el cual la inmunosupresión o la carcinogénesis puedan promover la recuperación del virus. Por otra parte se conoce muy poco sobre la forma en que este virus puede suprimir la aparición o alterar el curso de enfermedades neoplásicas.

Aunque se sigue estudiando sobre la especificidad en células diana de variantes de virus alotrópicos, se conoce muy poco sobre el virus en el campo. Las cepas de campo parecen ser más pantrópicas que las cepas de laboratorio, estas últimas las más frecuentemente estudiadas (Fikrig y Tattersall, 2012).

En Argentina se desconoce la prevalencia real de MVM en las colonias de producción e investigación de ratones por lo que este estudio permitirá conocer la situación de la mayoría de los bioterios del país.

Hipótesis y Objetivos

3. Hipótesis

El virus diminuto del ratón (MVM) es de alta prevalencia en las colonias de ratones de experimentación en Argentina y representa un factor de contaminación frecuente en los tumores humanos trasplantados en estos animales.

4. Objetivo general

Determinar la prevalencia de infecciones por MVM en colonias de ratones de Argentina y estudiar la influencia en la contaminación de tumores trasplantables.

4.1 Objetivos parciales

1. Estandarizar una técnica de Enzimoimmunoensayo (ELISA) para la detección de Ac contra MVM comparándola con la técnica de Inmunofluorescencia (IFI).

2. Estimar la prevalencia de Ac contra MVM en colonias de ratones de Argentina.

3. Desarrollar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN viral en ratones provenientes de diferentes colonias.

4. Estudiar la interferencia de la contaminación por MVM en tumores trasplantables en ratones.

Materiales y Métodos

5.1 Autorización del Proyecto

Este proyecto y el diseño experimental fue supervisado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, bajo el código N° 59-1-16T . Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de laboratorio del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

5.2 Flujograma de las actividades

Se diseñó un diagrama de flujo de las actividades desarrolladas (Figura 4) para una mejor comprensión y visualización de las etapas de este trabajo. Las pruebas serológicas y moleculares se realizaron en el Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) y en el Laboratorio de Virología (LAVIR) de la Cátedra de Virología. Los ensayos de interferencia de los trasplantes de tumores por MVM se hicieron en el LAE y en la Cátedra de Patología Especial y Necropsia.

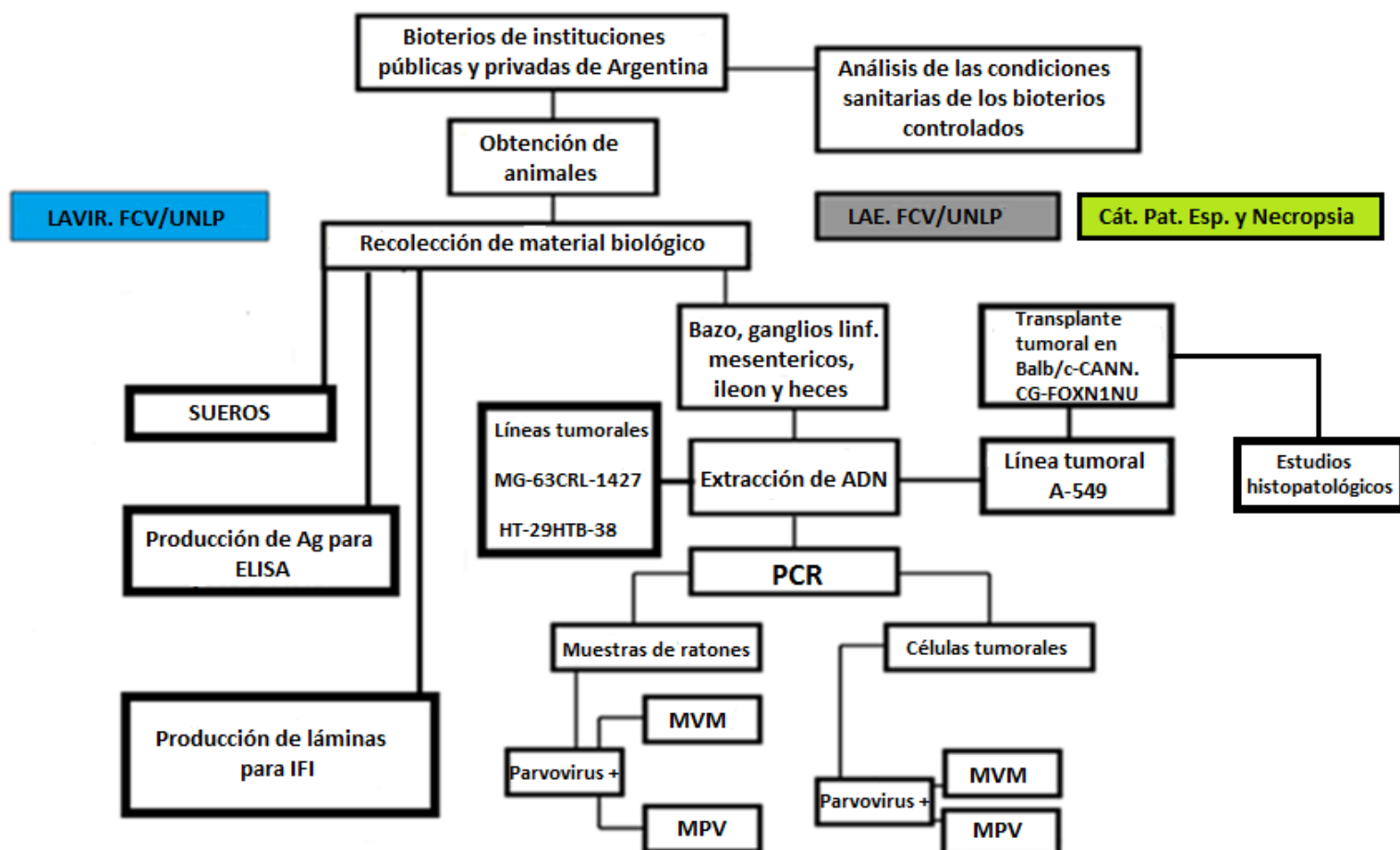


Figura 4. Diagrama de flujo de las actividades implementadas.

Objetivo 1

Estandarizar una técnica de Enzimoinmunoensayo (ELISA) para la detección de Ac contra MVM comparándola con la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

5.3 Virus, sueros de referencia y cultivos celulares.

Se utilizó la cepa prototipo del MVM (ATCC: VR-1346) donadas por el Dr. Rovilson Gilioli del Laboratorio de Control del Centro Multidisciplinar de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Campinas, Brasil (CEMIB-UNICAMP). La cepa originalmente provino de Hannover, Alemania donadas por el Prof. Dr. Volker Kraft del Laboratorio de Virología Zentralinstitut für Versuchstierzucht. Posteriormente fue genotipificada en el CEMIB-UNICAMP. Dos sueros de referencia (negativo y positivo) fueron cedidos además por el CEMIB-UNICAMP para la puesta a punto de la prueba de ELISA.

Se utilizaron cultivos de las líneas celulares L929 (fibroblastos de ratón) y BHK-21 (Baby Hamster Kidney) provenientes de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC). Las células se cultivaron en botellas de plástico desechable 75cm² (Costar, USA.) y, se incubaron en estufa a 37 °C, con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ como describen Freshney (1993) y Gilioli (2003). Para el desarrollo de los cultivos se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, Invitrogen, USA) suplementado con 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, USA), 100 UI/ml de penicilina – 100 µg/ml de estreptomicina (Ritchet, Buenos Aires, Argentina), 100 UI/ml de nistatina (Parafarm, Buenos Aires, Argentina) y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (MEM-C). Para el mantenimiento de las líneas celulares el SFB fue reducido a 2 % (MEM-M). Para la remoción de las células se utilizó tripsina (0,25 % w/v) – EDTA (0,2 % w/v) (Sigma – Aldrich, USA).

Las células L929 fueron infectadas con la cepa MVMp para producir semilla viral, se dejaron en adsorción 1 h a 37° y posteriormente se retiró el inóculo y se

agrego MEM-M. Las células se observaron diariamente hasta que el ECP fue total, se levantó el sobrenadante junto con las células, se congeló a -70°C y descongeló (tres veces), se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos, y el sobrenadante final se fraccionó y se conservó como semilla viral a -70°C para titular por la técnica de hemoaglutinación (HA).

5.4 Prueba de Hemaglutinación (HA) para la titulación de la semilla viral.

Se utilizaron placas de 96 well de fondo en U (Costar, EE.UU.). Se colocaron 100 μl de semilla viral diluida $\frac{1}{2}$ con solución tamponada de fosfatos (PBS) pH 7.2 en los pocillos A1 y B1 y 100 μl de sobrenadante de células sin infectar diluido $\frac{1}{2}$ en C1 y D1. En el resto de los pocillos de la placa se colocaron 50 μl de PBS. Se diluyó en base 2 (50 μl) desde A1-D1 hasta A12-D12. A toda la placa se le agregaron 50 μl de una suspensión de glóbulos rojos de cobayo (GR) al 1% (V/V) en PBS con 0,1 % (P/V) de seroalbúmina bovina (BSA MAKO). Las hileras E a H fueron utilizadas como control de GR. La lectura de la prueba se llevó a cabo después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente (T_a) controlada ($21-24^{\circ}\text{C}$). Se consideró como título hemaglutinante de la semilla viral a la dilución más alta capaz de producir la aglutinación total de los glóbulos rojos (1 UHA).

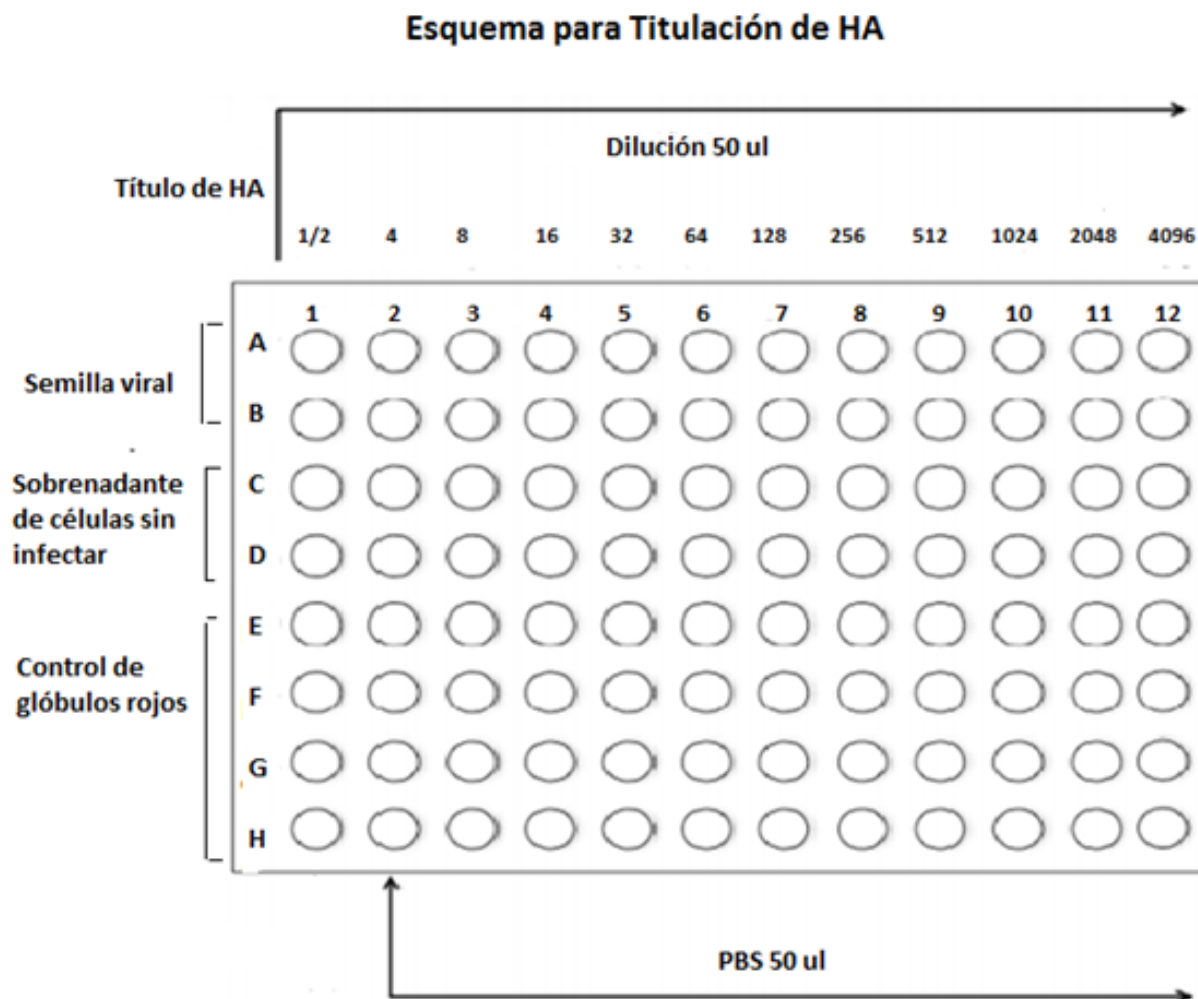


Figura 5. Esquema de la técnica de hemaglutinación para la titulación de la semilla viral.

5.5 Producción de Ag para la técnica de ELISA.

5.5.1 Producción de antígeno soluble a partir de células infectadas y tratadas con detergente.

Se infectaron células L929 no más de 24 hs de desarrollo en frascos T75 (Greiner Bio One) con 300 ul de la semilla viral, se dejaron en adsorción a 37°C durante 60 min agitando suavemente cada 15 min para favorecer la penetración homogénea del virus a las células. Posteriormente se retiró el inóculo, se completó

con MEM-M, se incubó a 37°C hasta que se observó ECP típico de redondeamiento celular y aumento de la refringencia, sin llegar a la lisis celular. Se levantaron las células de la superficie del frasco por barrido con una escobilla descartable, se centrifugó a 3.000 rpm (Centrífuga refrigerada Kubota modelo 1300, Japón) durante 20 min, se lavó el paquete celular 3 veces con *buffer* TE (Tris 0.01 M y EDTA 0.001 mol, pH 7.4) y se resuspendió, en un volumen 100 veces menor al original, en TE con Nonidet P40 al 1%. Se incubó durante 60 min a 4°C, luego se centrifugó a 5.000 rpm por 15 min y el sobrenadante resultante se centrifugó a 10.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804 R) durante una hora. Se fraccionó el sobrenadante final y se conservó a -70°C hasta su uso. Con idéntica metodología se preparó el Ag control negativo, partiendo de células no infectadas.

Estas experiencias fueron repetidas tres veces para confirmar los resultados (Laborde y col., 2008). Se realizó una HA para conocer el título viral y se obtuvieron títulos hemaglutinantes muy bajos. Se tituló para usarse en el ELISA, por la técnica de damero como se describe en puntos posteriores y resultó una dilución de uso de 1/10 por lo que se consideró no utilizarlo debido a su bajo rendimiento. Se procedió entonces a preparar otro Ag que se describe a continuación.

5.5.2 Producción de antígeno con viriones completos.

Células de línea BHK-21 desarrolladas en frascos T75 se infectaron (“Inf”) con 300 ul de la semilla viral de título HA de 1/128. Se realizaron ensayos en tres diferentes tiempos de infección: al momento de tripsinar las células y colocarlas en un nuevo frasco (“Inf 0”) y a las 12 y 24 h de desarrollo de la monocapa (“Inf 12” e “Inf 24”). En la prueba denominada “Inf 0” el ECP se observó a las 24 h (pi) y el sobrenadante que fue colectado a las 36 h pi fue titulado por HA como se describió precedentemente. En los otros dos experimentos (“Inf 12” e “Inf 24”) el

ECP no fue observado y el fenómeno de HA no fue detectado aun en el 5to día pi. Estas experiencias fueron repetidas tres veces para confirmar los resultados.

El sobrenadante (500 ml) de la experiencia “Inf 0” (título HA de 1/2048) fue usado para la preparación del Ag de ELISA. Luego del proceso de congelación-descongelación por tres veces, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm por 30 minutos y el nuevo sobrenadante fue concentrado por centrifugación a 25.000 rpm durante 5 hs a 4°C (centrífuga Beckman L8-80 M rotor 50Ti). El pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de PBS y colocado sobre un gradiente discontinuo de sucrosa 20-60% (V/V) y centrifugado como en la etapa de concentración (Figura 6).



Figura 6. Imagen representativa de la centrifugación en gradiente de sucrosa para la obtención de partículas de MVM. La banda más opaca en el centro del tubo se corresponde con una mayor concentración de las mismas.

La banda visible fue recolectada, diluida en un volumen equivalente (~2 ml) de PBS, precipitada nuevamente y diluida en 500 ul de PBS para la determinación

de la concentración de proteínas totales (Fluorómetro Qubit 2.0, Invitrogen, Life Technology, Japón).

Con el primer sobrenadante infeccioso recogido (título HA 1:2048) y con el Ag final se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida para confirmar la presencia de bandas de PM similar a las proteínas virales. El Ag fue fraccionado y conservado a -70°C hasta el momento de su uso.

5.6 Técnica de ELISA.

5.6.1 Titulación del Ag

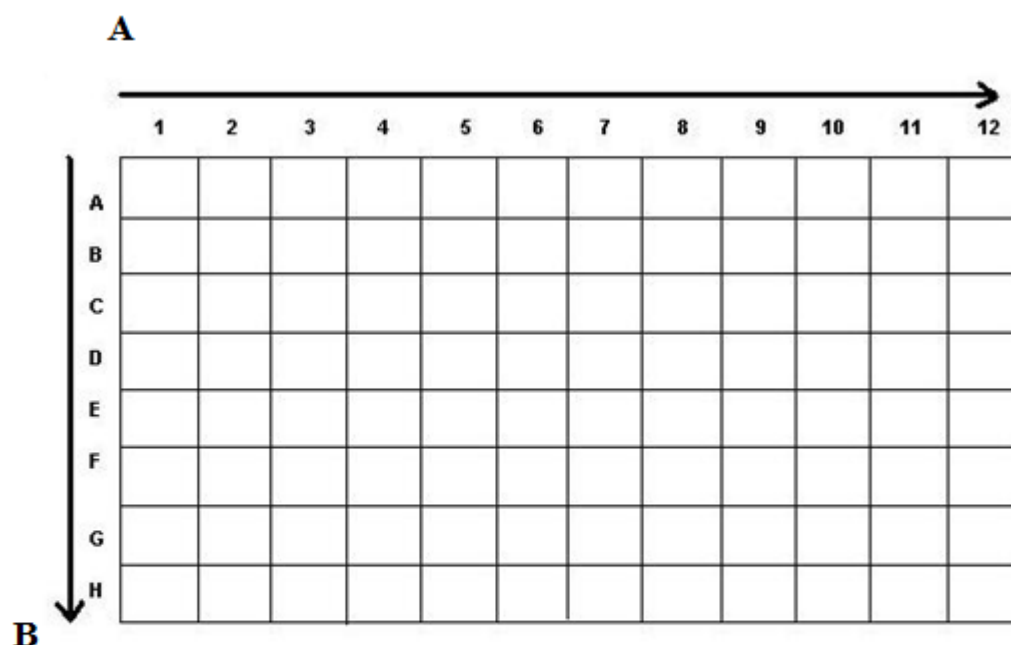
La mejor dilución de Ag fue establecida por una titulación en damero utilizando dos sueros de referencia (uno negativo y uno positivo) cedidos por el CEMIB-UNICAMP. En un primer paso el Ag fue pegado en las placas (NUNC Maxisorp, Hamburgo, Alemania) en un volumen final de 100 µl/pocillo desde una concentración de 6.24 (columna 1) a 0.003 µg/ml (columna 12) en buffer carbonato/bicarbonato (pH 9.6). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C, posteriormente se descartó el Ag y se bloqueó con 100 ul/pocillo de PBS con 0,1% de BSA durante 1 h a 37°C.

Las placas se lavaron cinco veces con PBS mas 0.5% de Tween 20 (PBST) y posteriormente se colocaron los sueros positivo y negativo de referencia, diluidos serialmente en base dos desde la dilución 1/5 hasta 1/640 (volumen final 50 ul por pocillo) en PBST mas 5% de leche en polvo descremada (PBSTL). Las placas se incubaron a Ta (22-24°C) durante 1 h y luego se lavaron cinco veces con PBST (Figura 7).

Como segundo Ac se utilizó un suero anti ratón conjugado con peroxidasa anti-ratón IgG peroxidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) en la dilución 1:2000 indicada por el fabricante (50 ul por pocillo) preparada en PBSTL y se incubó por 1h a Ta.

Finalmente se agregó la solución de sustrato constituida por 30 mg de ABTS (2, 2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid], Sigma-Aldrich, St

Louis, Missouri, USA) en 50 ml de fosfato de sodio 0.2 M, citrato 0,1M y 10 μ l de H_2O_2 30%. Se realizó la lectura de los valores de Densidad óptica (OD) a 405 nm usando un lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC, Vantaa, Finland) luego de incubación a 30, 40 y 60 min a Ta.



A: dilución de Antígeno.

B: dilución de Suero.

Figura 7. Titulación de Antígeno (Ag). Esquema indicativo sobre la disposición de las diluciones del Ag y de sueros de referencia.

5.6.2 Determinación de la dilución óptima de suero

Las diluciones de Ag 1:1600 (195 ng/ml) y 1:3200 (97.5 ng/ml) con las que se observó mayor diferencia de OD entre los sueros de referencia positivo y negativo fueron seleccionadas para determinar la dilución de suero a utilizar.

Se fijaron placas de ELISA con estas dos diluciones de Ag (100 ul por pocillo), individualmente, y luego de la adsorción durante toda la noche a 4°C se bloquearon como fue descrito. Posteriormente se utilizaron cuatro sueros de bioterios convencionales y clasificados previamente por IFI (2 positivos y 2 negativos) y los dos sueros de referencia que fueron diluidos con PBSTL en base dos, a partir de una dilución 1:5, desde la columna 1 hasta la 12 (50 ul por pocillo).

Se respetó el mismo tiempo y temperatura de incubación para estos sueros, anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa y sustrato que los descriptos para la titulación del Ag.

5.6.3 Reproducibilidad y repetibilidad

Para determinar la variabilidad dentro del laboratorio se determinó la reproducibilidad y repetibilidad dentro y entre las placas. Para esto, se realizaron 4 ensayos a diferentes días con las dos diluciones de Ag y 44 sueros provenientes de bioterios convencionales y clasificados previamente como positivos o negativos a MVM por IFI, dos sueros positivos a MPV cedidos por el CEMIB-UNICAMP y los dos sueros de referencia (positivo y negativo). Los sueros se analizaron por duplicado. La dispersión de la media de los valores de OD de cada suero fue analizada por el coeficiente de variación (CV) con 20% de tolerancia. La concordancia del coeficiente de correlación (CCC) fue utilizada para evaluar la repetibilidad. El análisis estadístico fue realizado con el Paquete estadístico Stata11®.

5.6.4 Análisis de un panel de sueros

Finalmente la dilución 1:3200 (97.5 ng/ml de proteínas) del Ag fue utilizada para el análisis de los sueros considerando que el mismo suero mostró valores de OD mas altos que con la dilución 1:1600.

Las etapas de fijación de Ag, bloqueo y lavados fueron las mismas que las ya descriptas. Posteriormente se analizaron 460 sueros provenientes de bioterios

convencionales y previamente determinados positivo o negativo por IFI. Se estudiaron en la dilución 1:10 previamente determinada. Luego de la colocación del sustrato se tomó como tiempo final de lectura a los 40 min (Figura 8).

Los resultados fueron normalizados utilizando la siguiente fórmula: $OD = OD - Nt / Pst - Nt$, donde OD es la media del valor de OD de cada suero determinado en pocillos duplicados y Pst y Nt de los sueros positivo y negativo controles, respectivamente (Sanchez y col., 2002).

El valor del punto de corte (*cutoff*) fue determinado por una curva ROC. El desarrollo del ELISA fue comparado con IFI por ser la técnica “gold standard”.

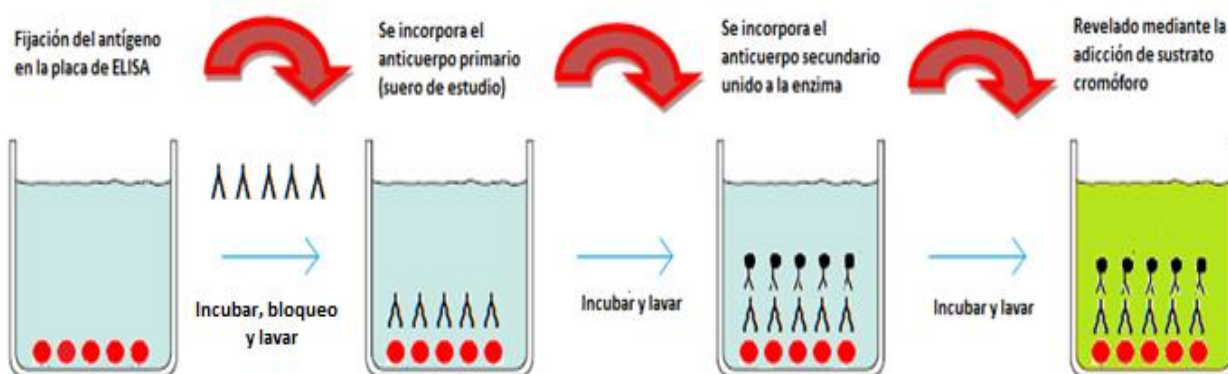


Figura 8. Esquema de la prueba de ELISA.

5.7 Preparación de láminas teflonadas para su utilización en la técnica de IFI

Para evitar contaminaciones por MVM en las instalaciones del LAE, el ensayo se realizó en la Cátedra y Laboratorio de Virología (LAVIR) de la FCV-UNLP. Las láminas se prepararon para analizar los sueros utilizados en la técnica de ELISA. Se utilizaron láminas teflonadas multitestes con 16 orificios de 3 mm de diámetro que se cubrieron con células L929 ($2,5 \times 10^5$ células/ml) re suspendidas en MEM-C, en un volumen de 10 ul por pocillo. Se incubaron a 37° bajo condiciones de esterilidad y en atmósfera controlada con dióxido de carbono (CO₂). A las 18 hs y habiéndose constatado el crecimiento celular, se colocó semilla viral de MVM preparada en diluciones, desde 1:2 hasta 1:256. Se

incubaron nuevamente las láminas en las condiciones descriptas para determinar la dilución más alta que mostró aproximadamente el 50% de ECP en las células.

A continuación el medio de cultivo se retiró asépticamente y se realizó la fijación de las láminas por inmersión durante 10 minutos en acetona (Merck, Alemania) conservada a -20°C. Una vez establecida la dilución de la semilla viral a utilizar se prepararon suficientes láminas para todo el estudio viral. Las láminas se colocaron en cajas de plástico (Clay Adams, USA) y se congelaron a -70°C hasta el momento de uso.

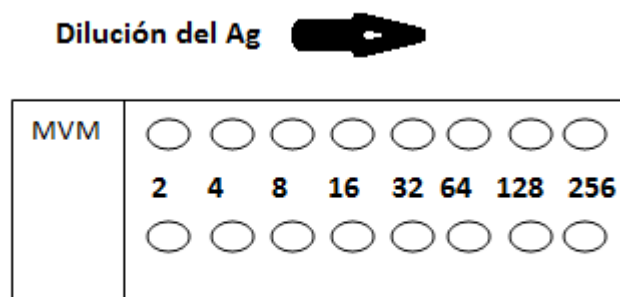


Figura 9. Dilución de la semilla viral colocada sobre células L929 desarrolladas en los pocillos de las láminas teflonadas.

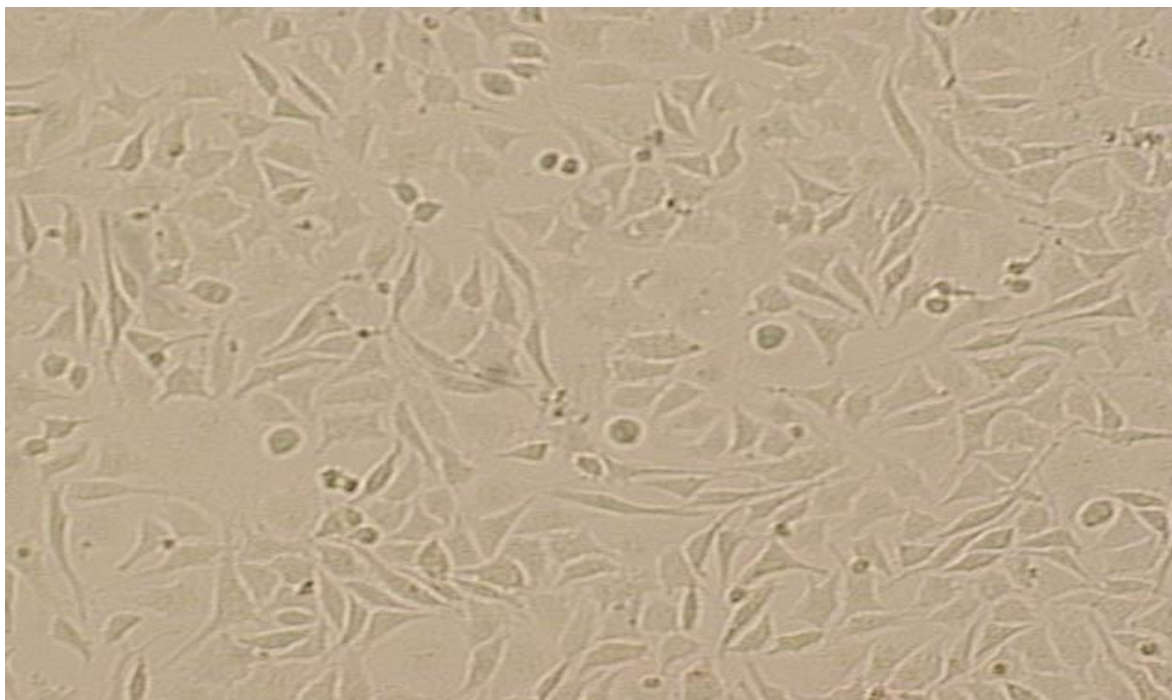


Figura 10. Cultivo de células L929 en láminas teflonadas (aumento 10X).

5.8 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para MVM.

Se realizó la prueba IFI como se describe por Kraft y Meyer (1986) y Gilioli (2003). Los sueros del ensayo fueron utilizados en una dilución 1:20 con PBS y un volumen de 10 ul/pocillo. Se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos a Ta, las láminas se lavaron con PBS durante 10 minutos y luego se añadieron 7 ul de anti-IgG de ratón conjugado con FITC diluido 1:80 según indicaciones del fabricante (Sigma, USA.) y 1 ul de colorante azul de Evans (Merck, Alemania) 1: 300 en cada orificio de la lámina y se incubó durante 30 minutos en las mismas condiciones y en cámara oscura. Luego las láminas se lavaron con PBS durante 10 min por 3 veces y luego en agua destilada durante un minuto para posteriormente ser montadas en portaobjetos de vidrio 24x50 mm (Pro-Cito, Argentina) utilizando una solución alcalina de glicerina tampón (nueve partes Glicerina PA (Merck) y una parte de solución de carbonato-bicarbonato (0,5 M pH 8,5). La lectura de las láminas se realizó en microscopio de fluorescencia (Olympus, modelo BH2-RFCA), con lámpara de mercurio de 50 W de excitación

de luz ultravioleta BG 38 y un filtro de 450-490nm, con aumento final 400x. Se incluyeron en cada lámina sueros control positivo y negativo. Un resultado positivo se determinó por la comparación de la intensidad y la distribución de fluorescencia con los respectivos controles.

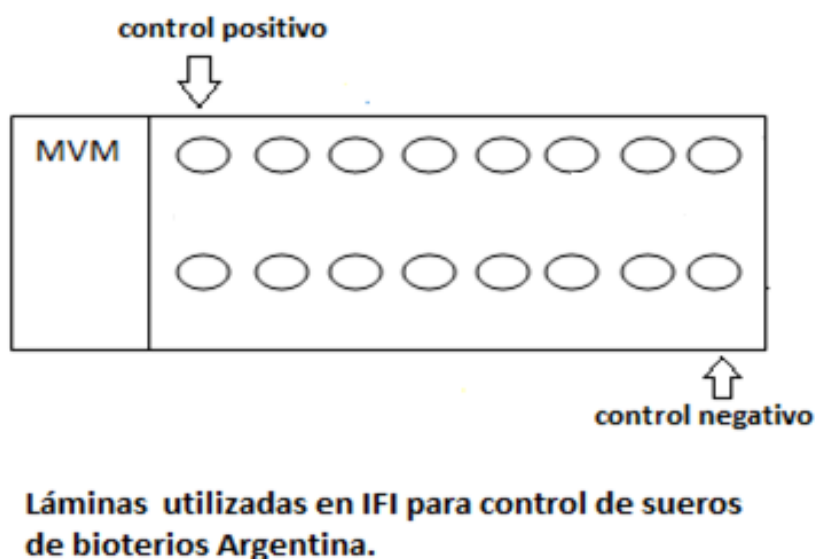


Figura 11. Láminas teflonadas infectadas con MVM para ser utilizadas en IFI en el control de sueros de bioterios de Argentina.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como sueros positivos y negativos de referencia.

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Suero policlonal anti-MVM CEMIB-UNICAMP (referencia)	Anti-ratón FITC (SIGMA)
Suero negativo CEMIB- UNICAMP (referencia)	Anti-ratón FITC (SIGMA)

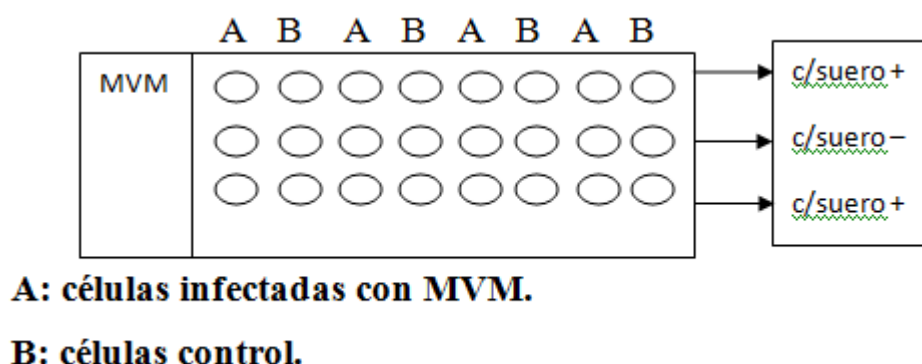


Figura 12. Lámina teflonada para IFI producidas en LAE y LAVIR, utilizando células L929 infectadas con MVM para el control de sueros positivos y negativos de referencia (CEMIB-UNICAMP).

5.9 Inoculación experimental en ratones BALB/c para la detección de anticuerpos contra MVM por IFI y ELISA y toma de muestras para extracción de ADN a utilizar en PCR.

Para evitar contaminaciones por MVM en las instalaciones del LAE, las pruebas experimentales de inoculación se realizaron en dependencias de la FCV, UNLP que poseen una cabina aisladora para mantener los animales en experiencia. Se realizó la obtención de sueros policlonales mono específicos anti-MVM y sueros negativos en ratones de la cepa BALB/c para controlarlos por IFI y ELISA, de acuerdo con el Manual de Procedimientos de Diagnóstico para las infecciones virales en roedores de laboratorio (1978). En concordancia con los preceptos de las tres R's (Refinamiento, Reducción y Reemplazo) en esta prueba los animales fueron utilizados tanto en el desarrollo e investigación de Ac contra MVM en los ensayos serológicos (IFI y ELISA) y para obtención de ADN viral en las técnicas moleculares (PCR) que se detallan en el ítem 5.14. En la experiencia se utilizaron 28 ratones BALB/c distribuidos en tres grupos de 7 animales y fueron inoculados por vía oral, intraperitoneal y endovenosa (cada grupo por una vía) con una dosis de 0,1 ml (cada animal) de una solución de 50 ng/ml de MVM diluida en

solución salina de Hank's (H) 0,9% y un grupo control de 7 animales sin inocular, que se mantuvieron bajo condiciones adecuadas en microaisladores. Se utilizó la misma dosis en todas las vías para minimizar variables en la ocurrencia de MVM.

Se utilizó Adyuvante Completo de Freund en la inoculación por vía intraperitoneal (Tabla 4). Luego se realizó la eutanasia de 3 animales (1 inoculado por diferente vía) cada 7 días pi con una mezcla de CO₂/O₂ (70/30%) en una cámara adecuada y se realizó la toma de sangre por cardiocentesis. También se procedió de la misma manera y se tomaron muestras de sangre de los animales control (sin inocular) a los 7, 14 y 21 días (1 animal en cada día). Una vez formado el coágulo se dejaron los tubos durante 12 hs a 4°C y luego se centrifugó a 800 rpm x 10 minutos en una centrífuga (Kubota 1300, Japón) y se extrajo el suero.

Los sueros fueron inactivados por calor a 56 °C durante 30 minutos por baño maría y se diluyeron 1:5 en PBS 0,01 M pH 7,2. Luego se alicuotaron y se guardaron a -70°C. Los sueros producidos de la toma de muestra de los días 21 y 28 (pi) fueron controlados por IFI y ELISA. (Tabla 4). Se procedió de igual manera con los sueros de los animales sin inocular. Los sueros se utilizaron en la dilución 1/20 en solución tamponada de fosfatos (PBS 0,01 M pH 7,2) y la técnica se desarrolló sobre láminas teflonadas con células infectadas fijadas en acetona fría.

El conjugado anti-ratón (cabra anti IgG de ratón) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, USA) fue utilizado como 2do Ac.

Tabla 4. Inoculación de ratones BALB/c con una solución de sobrenadante de células BHK-21 infectadas con MVM (HA 1/2048). La colecta de sangre de los animales inoculados fue a los 21 y 28 días pos inoculación. La cardiocentesis se realizó en 3 animales (inoculados por diferente vía) cada día. La obtención de sueros de los animales control (sin inocular) fue a los 14, 21 y 28 días pos inoculación.

Grupo	Vía	Adyuvante (AFC)	Volumen/Dosis
A (7 animales)	IP	SI	0,1 ml x 1
B (7 animales)	Oral	NO	0,1 ml x 1
C (7 animales)	IV	NO	0,1 ml x 1
D (3 animales)	Grupo control sin inocular		

IP: intraperitoneal; **Oral:** (sonda esofágica); **IV:** intravenosa; **AFC:** adyuvante de Freund Completo.

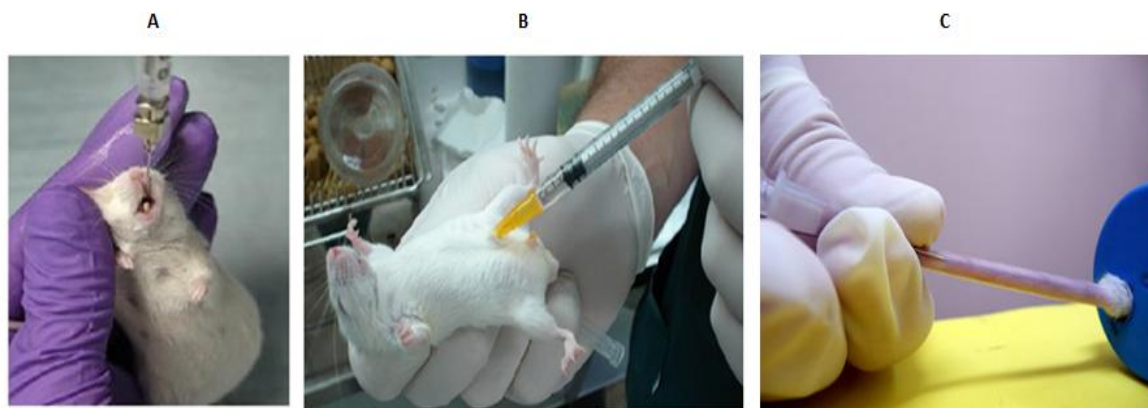


Figura 13. Detalle de las inoculaciones en ratón: **A** (oral), **B** (intraperitoneal) y **C** (intravenosa).

Objetivo 2

Estimar la prevalencia de Ac contra MVM en colonias de ratones de Argentina.

5.10 Instituciones, información y muestras para el estudio de prevalencia de MVM.

Para estudiar la prevalencia de MVM se evaluaron 46 instalaciones o bioterios para animales de 46 instituciones públicas y privadas en Argentina de las cuales cuarenta se encuentran en la provincia de Buenos Aires y seis en otras partes del país en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Mendoza, siendo instituciones donde se desarrolla la enseñanza y / o investigación, además de producir productos farmacéuticos, vacunas y desarrollar el control de calidad de inmunobiológicos. El estudio comprendió el análisis de muestras en un período desde el año 2010 al 2015 (Figura 14).

El estudio de la prevalencia se realizó empleando la técnica de ELISA comparada con la IFI y una técnica molecular (PCR).

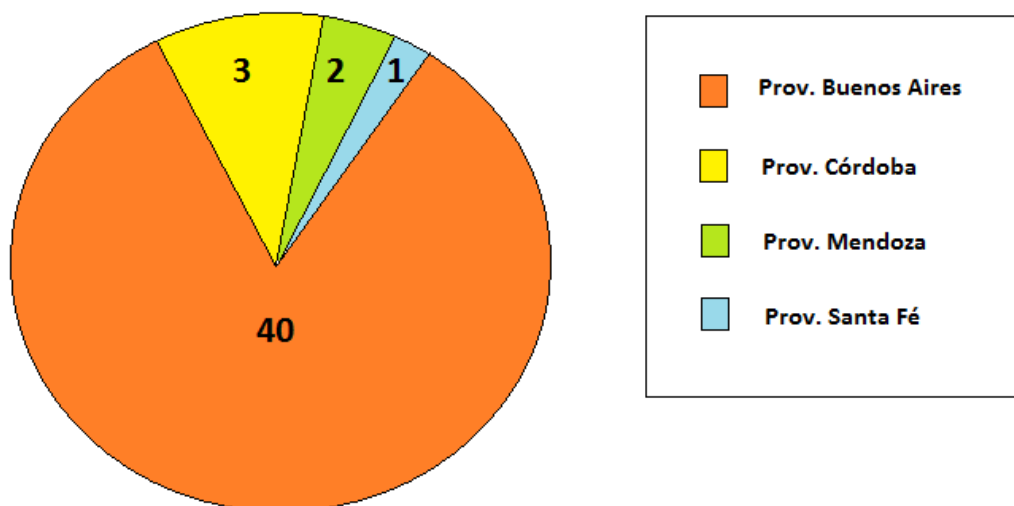


Figura 14. Gráfico representativo del número de bioterios controlados de Argentina durante el período 2010-2015. La mayoría de los mismos se encuentran en la Provincia de Buenos Aires.

El procedimiento estándar al recibir a los animales consiste en el archivo de la planilla que las instituciones completan con toda la información que suministran los responsables del bioterio. En algunos casos fue necesario obtener más información para evaluar las condiciones sanitarias de los mismos.

La mayoría de las instituciones (n=44) poseían bioterios convencionales al momento de la toma de las muestras. Otras (2 instituciones) que adquirieron racks ventilados, tenían el propósito de producir ratones de laboratorio con una alta calidad de salud para satisfacer las exigencias de la investigación y control inmunobiológicos, como también la producción y mantenimiento de animales transgénicos.

La información recabada de cada una de las instalaciones estuvo relacionada con la existencia de sistemas de barreras de protección (infraestructura, equipamiento y procedimientos estándar) contra la entrada de agentes infecciosos. Los principales elementos consultados fueron: instalaciones adecuadas con barreras sanitarias y programa de vigilancia sanitaria. La información solicitada se basó en los criterios establecidos por el programa de vigilancia de la salud de los animales y en las recomendaciones internacionales de la Consejo Internacional para la Ciencia Animal de Laboratorio (ICLAS) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

5.11 Muestreo de animales.

En cuanto al número de animales evaluados (A), el tamaño de la muestra fue determinado por la fórmula estadística: $A = \alpha \log\text{-}\log / (1-P)$, donde A = tamaño muestra, P = porcentaje de animales infectados en la colonia, y α = límite de confianza. Siendo $P = 0,25$ $\alpha = 0,05$ y $A = 10$ animales, existe 95% de probabilidad de detectar al menos un animal positivo en la muestra evaluada (ILAR, 1976; Nicklas, 2002).

Para estudiar la prevalencia de MVM fueron evaluados 460 animales (muestras de suero y bazo) y 46 pool de heces de ratones machos y hembras. La mayoría de los ratones (n = 460) tenían una edad de 8 a 10 semanas y también

animales jóvenes de 4 a 5 semanas en cada bioterio; de diferentes cepas, siendo en su mayoría BALB/c, C57BL y Swiss. La proporción de sexos fue de 50% machos y 50% hembras.

Los animales de cada institución fueron separados por sexo y fueron transportados en cajas adecuadas para los mismos. Luego de la recepción en el laboratorio de destino (LAE), fueron identificados y registrados en la forma apropiada, inspeccionados para evaluar la salud general y la presencia de lesiones visibles. De las cajas donde estaban alojados se realizó la colecta de heces. Luego los animales fueron sometidos a eutanasia por inhalación de una mezcla de dióxido de carbono y oxígeno (30/70%) en una cámara apropiada. Posteriormente se realizó el sangrado a blanco por punción cardíaca para extracción de sangre y producción de suero de igual forma como la descrita en el ítem 5.9. Durante la necropsia se extrajo el bazo de cada animal. Los bazos se recogieron en tubos Eppendorf (Costar, EE.UU.), etiquetados y se congelaron a -20°C hasta el momento de uso.

5.12 Análisis estadístico.

Para los estudios de prevalencia se aplicó un diseño epidemiológico descriptivo (Milos J, 1996). Al no existir información previa suficiente de infecciones producidas por este patógeno en Argentina y considerando que es fácilmente transmisible, se trabajó con una muestra para una población de tamaño desconocida, con prevalencia de 50% (con variación máxima de 10%) y un nivel de confianza de 99% arrojando un resultado de $n=400$.

Objetivo 3

Desarrollar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN viral en ratones provenientes de diferentes colonias.

5.13 Obtención de los controles positivos para los ensayos de PCR.

Debido a la reacción cruzada que presentan las técnicas de diagnóstico serológicas para resultados positivos contra MVM y MPV se desarrolló una técnica de PCR que permitió discriminar ambos virus en los resultados positivos por serología. Por tal motivo fue necesario obtener controles positivos para MVM y MPV. El control positivo patrón para MVM fue cedido por el Dr. Gilioli del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (CEMIB-UNICAMP). El control positivo para el MPV fue obtenido de muestras de heces y bazo de ratones durante los ensayos realizados por la técnica de PCR en este estudio.

5.14 Obtención de muestras de ADN de MVM para el control por PCR.

Los animales utilizados en el ensayo del ítem 5.9 aportaron ADN de MVM de órganos, tejidos y heces infectados con el virus para establecer el periodo de tiempo de detección de MVM en heces y tejidos (PCR) y anticuerpos (por IFI) durante el ensayo, dependiendo de la vía de inoculación y la muestra, considerando los informes de la literatura para demostrar que el virus se detecta en los primeros días pos infección en varios órganos, tejidos y heces de los animales inoculados experimentalmente (Jacoby y col., 1991). El proceso se realizó durante un período total de 49 días luego de la inoculación viral (día 0) para determinar el intervalo de tiempo de detección, derramamiento viral y anticuerpos de las diferentes muestras de los animales (Tabla 5). Con la finalidad de comprobar el período de derramamiento viral y comparar la estabilidad en el ambiente de MVM se procedió a tomar muestras de heces cada 3 días por

duplicado durante toda la experiencia y se dejó una muestra a temperatura ambiente (Ta) por 5 días y la otra a -70 antes de procesarlas. Se realizó la eutanasia de 3 animales inoculados (1 inoculado por diferente vía) cada 7 días con una mezcla de CO₂/O₂ en una cámara adecuada y se realizó la obtención de sangre por cardiocentesis (a partir del día 7) y necropsia para la recolección de material biológico (bazo y ganglios linfáticos mesentéricos e íleon con placas de Peter); las muestras de heces se colectaron de la cama sucia de los animales inoculados.

Las muestras de heces se tomaron por duplicado y una se guardó a -70°C y la otra se dejó por 7 días a temperatura ambiente para demostrar la estabilidad de MVM a agentes ambientales. Todas las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de tipo (Costar, USA), se identificaron y se congelaron a -70 °C (excepto las muestras de heces a T° ambiente) hasta el momento de procesarlas para la extracción de ADN. Las muestras fueron procesadas con los Kits de extracción de ADN para tejido y heces correspondientes a fin de realizar posteriormente la técnica de PCR. De las muestras de sangre se obtuvieron los sueros y se procedió según 5.12. Los 3 animales control (sin inocular) fueron sacrificados los días 14,21 y 28 (1 animal por día) y con las muestras para obtención de suero y ADN se procedió de igual manera que con los ratones inoculados.

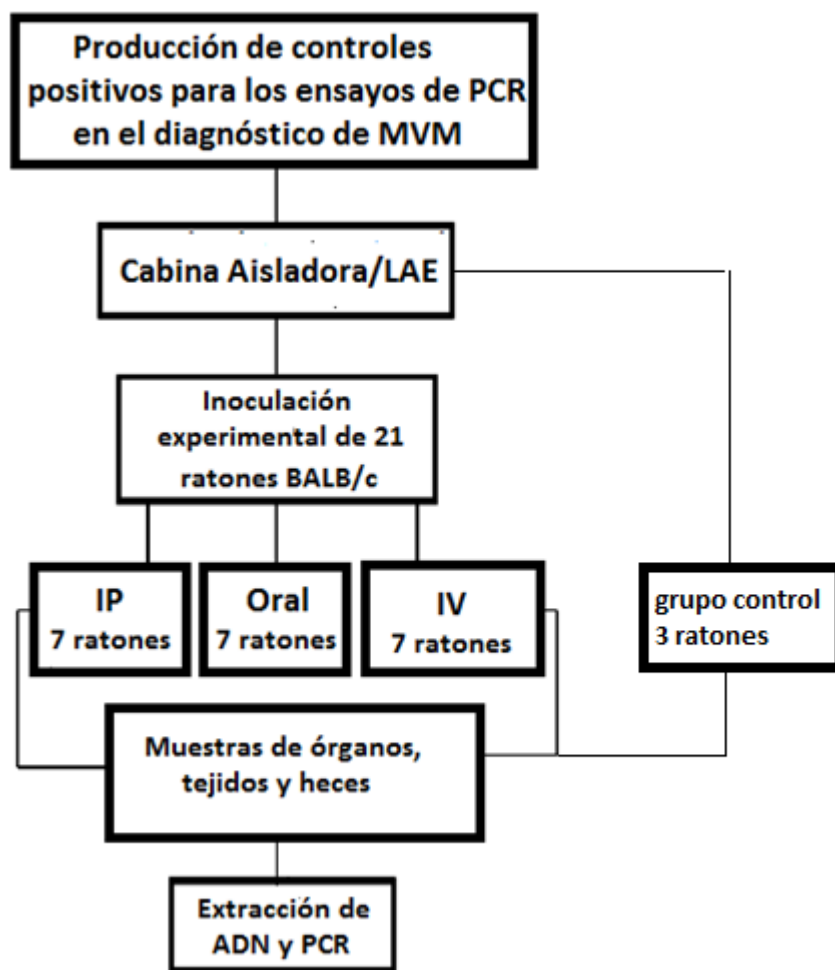


Figura 15. Diagrama de flujo de las actividades desarrolladas para la producción de controles (positivo y negativo) para los ensayos de PCR en el diagnóstico de MVM. Los ensayos de las inoculaciones experimentales fueron desarrollados en instalaciones (Cabina Aisladora) pertenecientes al LAE.

Tabla 5. En el esquema se observa la toma de muestras durante la experiencia de todos los grupos de animales inoculados y control.

Día/recolección de muestra (•) (suero)	(heces)	(bazo, íleon, ganglios)
1 (inoculación viral)		
3	•	
6	•	
7		•
9	•	
12	•	
14		•
15	•	
18	•	
21	•	•
24	•	
27	•	
28		•
30	•	
33	•	
35		•
36	•	
39	•	
42	•	•
45	•	
48	•	
49		•

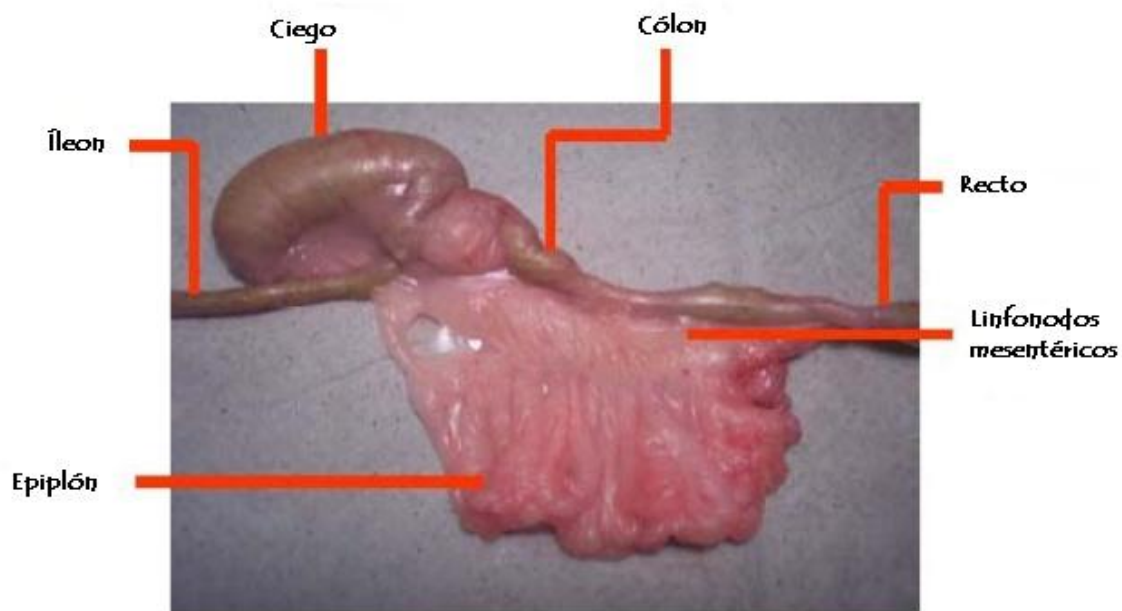


Figura 16. En la foto se observa en detalle la región de toma de muestras (linfonodos mesentéricos) de un ratón infectado con MVM para extracción de ADN.

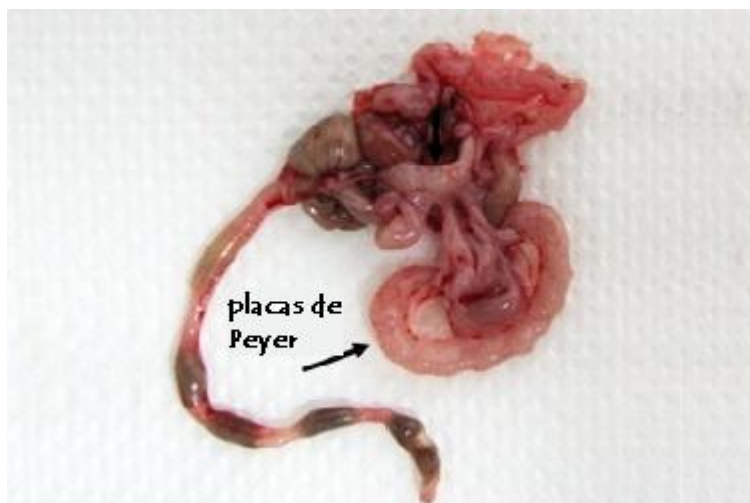


Figura 17. Región del íleon (Placas de Peter) de un ratón infectado con MVM utilizado en la toma de muestras y extracción de ADN.

5.15 Extracción de ADN.

El ADN total de bazo, nódulos linfáticos mesentéricos e íleon se aisló con UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit MO BIO (USA) y el ADN total de las heces por Power Fecal DNA Isolation Kit MO BIO (USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El volumen de cada muestra de ADN (bazo, ganglios linfáticos, íleon y heces) fue de 50 ul.

Las extracciones de ADN se realizaron en condiciones de seguridad biológica en flujo laminar de clase I. Para la descontaminación de la superficie de trabajo y el material antes del inicio de las actividades se utilizó alcohol 70% y luz ultravioleta. Durante los procedimientos de la extracción de ADN, se evaluó la posibilidad de la contaminación cruzada a través de la inclusión de una muestra de control negativo conocido junto con la muestra de ensayo y su posterior amplificación por PCR. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de uso.

5.16 Reacción de la Cadena de la Polimerasa.

Los ensayos de PCR se realizaron sobre la base de los métodos descritos en la literatura con algunas modificaciones. Los cebadores utilizados en este estudio fueron obtenidos de Integrated DNA Technologies IDT (USA) y fueron publicados en presentaciones científicas: Parvovirus de roedores (PAR); MVM-específico y MPV específico. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que codifican las VP y NS de Parvovirus genérico y las VP de MVM y MPV.

Para el diseño de los cebadores en primer lugar se realizó un alineamiento múltiple de secuencia utilizando el programa Clustal X, cada par de oligonucleótidos se diseñó teniendo en cuenta el consenso entre las secuencias alineadas. La secuencia del cebador, el tamaño del producto amplificado y el perfil de las reacciones en el termociclador se muestra en la tabla 7. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700

(Applied Biosystems, CA, USA) con un volumen final de 25,0µl para los ensayos de PCR PAR, MPV y MVM y un tiempo total de 105 minutos por muestra.

Para determinar el mejor órgano/tejido de muestra a utilizar inicialmente se realizó una PCR de los animales experimentalmente inoculados con MVM. Una vez seleccionado el órgano apropiado para el muestreo, se analizaron un total de 460 ratones para calcular la prevalencia viral.

Marcadores de peso molecular de 100pb se utilizaron para confirmar el tamaño de los productos amplificados.

Tabla 6. Se detalla la secuencia de Oligonucleótidos utilizados y las condiciones de la reacción de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los cebadores.

Ensayo de PCR para Parvovirus de roedores, MVM y MPV			
Control de PCR	Secuencia del iniciador (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Perfil de los ciclos
Parvovirus de roedores (PAR)	CTAATGCTTGGGGAGTTTGG CTWGGTTTGTGTTCAAGATC	1100	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos
MVM	CTAATGCTTGGGGAGTTTGG GCTTCACTCACCCAGTTAAC	640	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos
MPV	CTAATGCTTGGGGAGTTTGG AARTAGTACCTGTAAGGACT	300	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos

La primera reacción de PCR se realizó mediante la adición de 5 ul de ADN a una mezcla de reacción (volumen final de 25 ul) que contenía una concentración final de 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,01% de Tween 20,

200 mM de cada uno de los dNTP, 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) y 0,5 mM de cada uno de los cebadores. La técnica de PCR se llevó a cabo utilizando un protocolo térmico que consistió en un ciclo de desnaturalización de 4 min a 94 ° C, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 seg a 94 ° C, 45 seg a 60 ° C y la extensión de tiempo de 1 min a 72 ° C). Se añadió un ciclo de extensión final de 5 min a 72 ° C para completar la polimerización.

Se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa (1,5%) con un volumen de 15 ul de los productos obtenidos a partir de reacciones de PCR. Se utilizó una cubeta horizontal *MUPID-2* (Cosmo-Bio) en condiciones de voltaje constante de 100V durante 45 min aproximadamente y se utilizó para la tinción del gel el SYBR Safe DNA gel stain INVITROGEN. Luego se visualizaron los geles en transiluminador de luz azul y fueron fotografiados con la cámara digital. Se utilizó una cepa prototipo de MVM como control positivo y también un control negativo.

Objetivo 4

Estudiar la interferencia de la contaminación por MVM en tumores trasplantables en ratones.

5.17 Trasplante de tumores en ratones utilizados en experimentación.

Mediante la técnica de trasplante tumoral se realizó el trasplante de la línea tumoral humana de adenocarcinoma de pulmón A549 e inoculación viral en ratones de la cepa N: NIH(S)-*un* para observar la posible interferencia del Ag viral en la reducción de la tasa de crecimiento tumoral o en el impedimento del desarrollo del mismo (oncólisis).

Se utilizaron animales que son ratones mutantes que portan una mutación simple y son utilizados como modelos animales en la experimentación científica. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada *nude (nu)*. Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11. El ratón *nude* homocigoto, además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo, carece de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados.

Se formaron cuatro grupos de 5 animales cada uno. Los animales de cada grupo se pesaron, anestesiaron y se inocularon bajo una campana de flujo laminar:

Grupo A: se inoculó por vía subcutánea (SC), en la piel laxa del dorso, con una suspensión de células viables de la línea tumoral humana de adenocarcinoma de pulmón A549 en una concentración de 25×10^4 en 200 μ l (T-A549) de solución salina H y por vía intraperitoneal (IP) con una solución de 50 ng/ml de MVM.

Grupo B: se inocularon por vía SC con T-A549 en una concentración de 25×10^4 en 200 μ l (T-A549) de H.

Grupo C: se inocularon por vía IP con MVM (50ng/ml) con H.

Grupo D: se inocularon por SC, con H.

A continuación de muestra un diagrama de tareas.

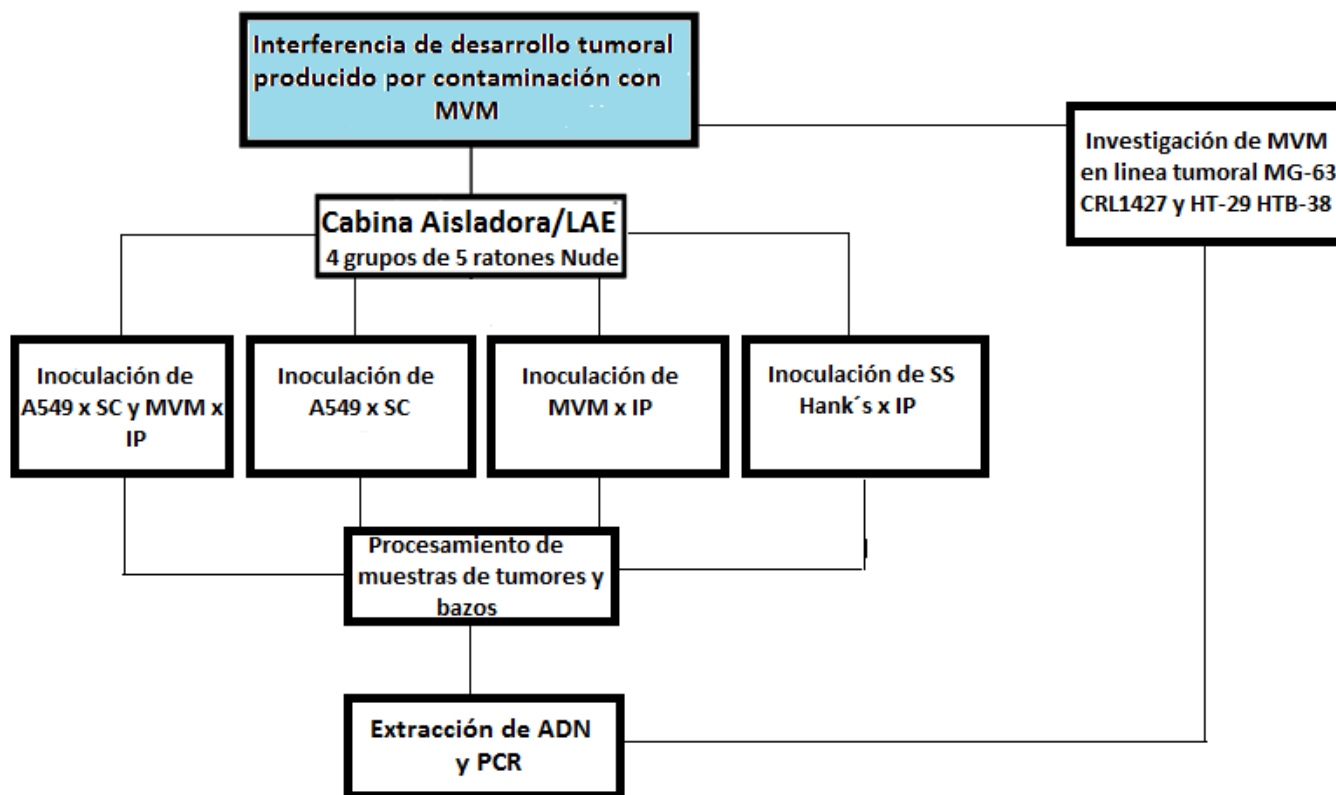


Figura 18. Diagrama de tareas en la interferencia de desarrollo tumoral de trasplante por MVM en los 4 grupos de ratones NUDE e investigación de contaminación por MVM en líneas tumorales utilizadas en LAE.

Todos los individuos se alojaron en microaisladores. Se realizaron controles diarios para verificar el crecimiento tumoral utilizando un calibre. En caso de desarrollo de tumoral y cuando los mismos llegaron a un tamaño de 12 x 9 mm los ratones se sacrificaron con una mezcla de dióxido de carbono y oxígeno (70/30%), para proceder a la extracción de los tumores, realizar la necropsia y examinar los órganos para detectar la aparición de metástasis. Se realizó la extracción de bazo para controlar por PCR si hubo infección en los animales y tumores con MVM.

También se realizó un estudio de investigación de contaminación con parvovirus genérico y MVM de las líneas celulares de osteosarcoma humano (MG-

63 CRL 1427) y la de adenocarcinoma de colon colorectal humano (HT-29 HTB-38) que son trasplantadas en forma rutinaria en las instalaciones del LAE en cepas de ratones inmunodeficientes N: NIH(S)- Foxn1^{nu} y BALB/c-CAnN.Cg-Foxn1^{nu} como parte del Proyecto de Incentivos que se está desarrollando hasta el presente año.



Figura 19. Ratones Nude en los que se ha realizado trasplante de la línea tumoral A549.

Resultados

OBJETIVO 1

Estandarizar una técnica de Enzimoinmunoensayo (ELISA) para la detección de Ac contra MVM comparándola con la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

6.1 Técnica de ELISA

6.1.1 Titulación del Ag

Por las razones expuestas en la sección Materiales y Métodos y debido a que el Ag realizado con células infectadas lisadas con detergente, no demostró ser rendidor para llevar a cabo la técnica, se siguió trabajando con el Ag realizado con partículas virales purificadas. Se utilizaron las células denominadas “Inf 0” (BHK-21 infectadas con la cepa MVMp simultaneamente en el frasco de cultivo) que demostraron producir ECP y poseer capacidad hemaglutinante de 1:2048 a las 36 hs. pi.

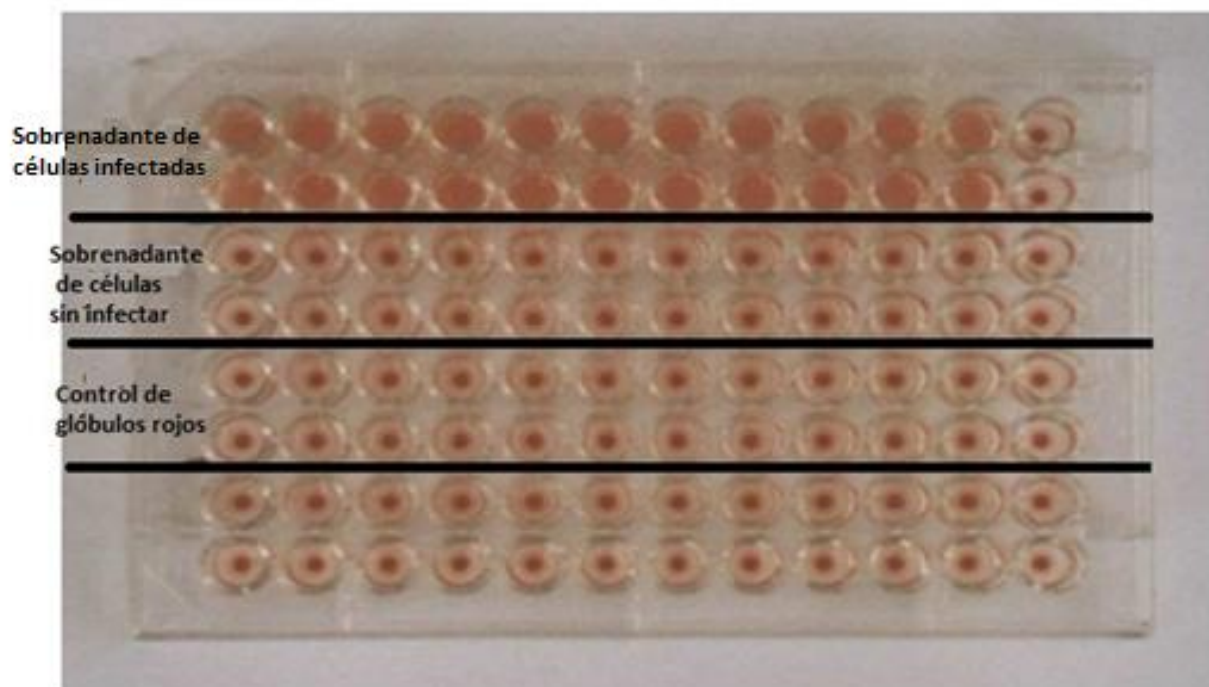


Figura 20. Técnica de hemaglutinación.

El ensayo de SDS-PAGE desarrollado con el primer sobrenadante infeccioso cosechado y el Ag final confirmó la presencia de bandas de PM similar a las proteínas virales (Figura 21).

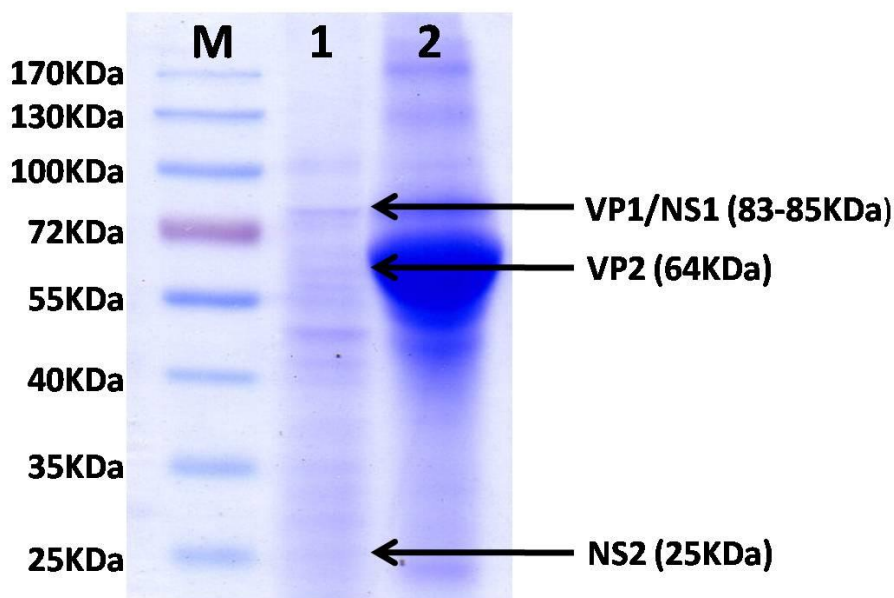


Figura 21. Análisis por SDS-PAGE. Línea M: marcador de PM con el tamaño de bandas indicado. Línea 1: dilución 1:100 del Ag de ELISA. Las flechas indican las bandas de las proteínas virales y el PM entre paréntesis: VP1/NS1 (83-85 kDa), VP2 (64 kDa) y NS2 (25 kDa). Línea 2: sobrenadante de 36 h de cultivo de células BHK-21 infectadas simultáneamente con MVMp. Se observa una banda de 66 kDa correspondiente a la BSA.

La concentración del Ag purificado resultó de 312 ug/ml de proteínas virales totales. Con la titulación en damero (Figura 22), las diluciones de Ag 1:1600 (195 ng/ml) y 1:3200 (97.5 ng/ml) con las que se observó mayor diferencia de OD entre los sueros de referencia positivo y negativo fueron seleccionadas para determinar la dilución de suero a utilizar que para ambas concentraciones de Ag fue de 1:10.

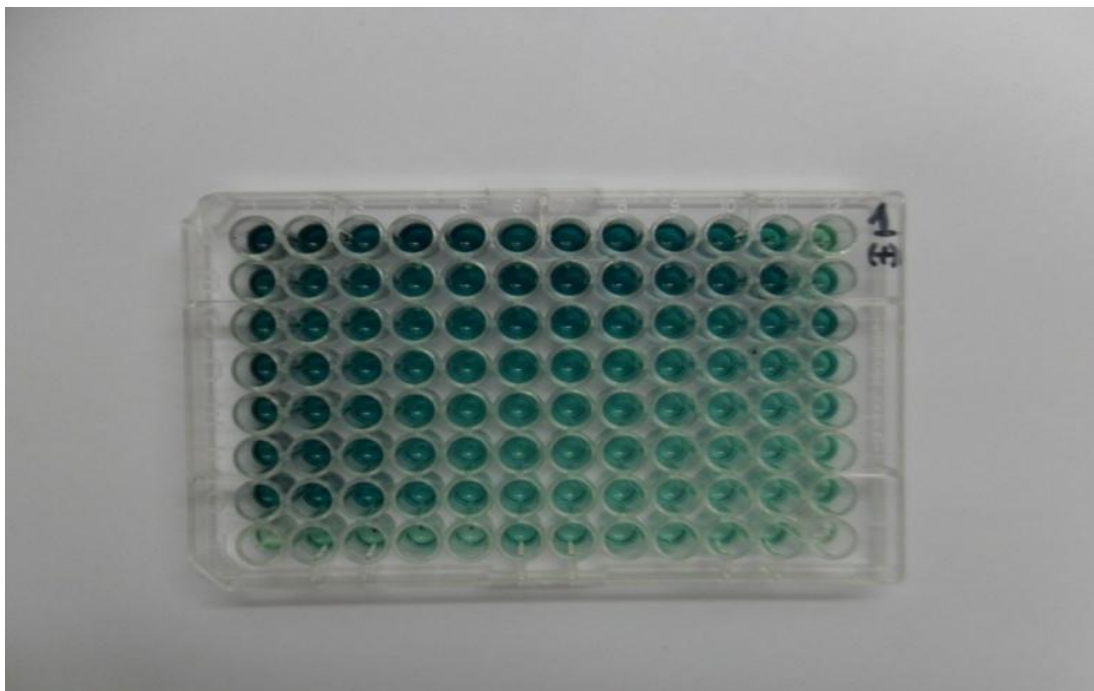


Figura 22. Imagen de placa de titulación del Ag por la técnica de damero

La dilución 1:3200 (97.5 ng/ml de proteínas) del Ag fue finalmente seleccionada para el análisis de todos los sueros considerando que el mismo suero mostró valores de OD mas altos que con la dilución 1:1600 (Figura 23).

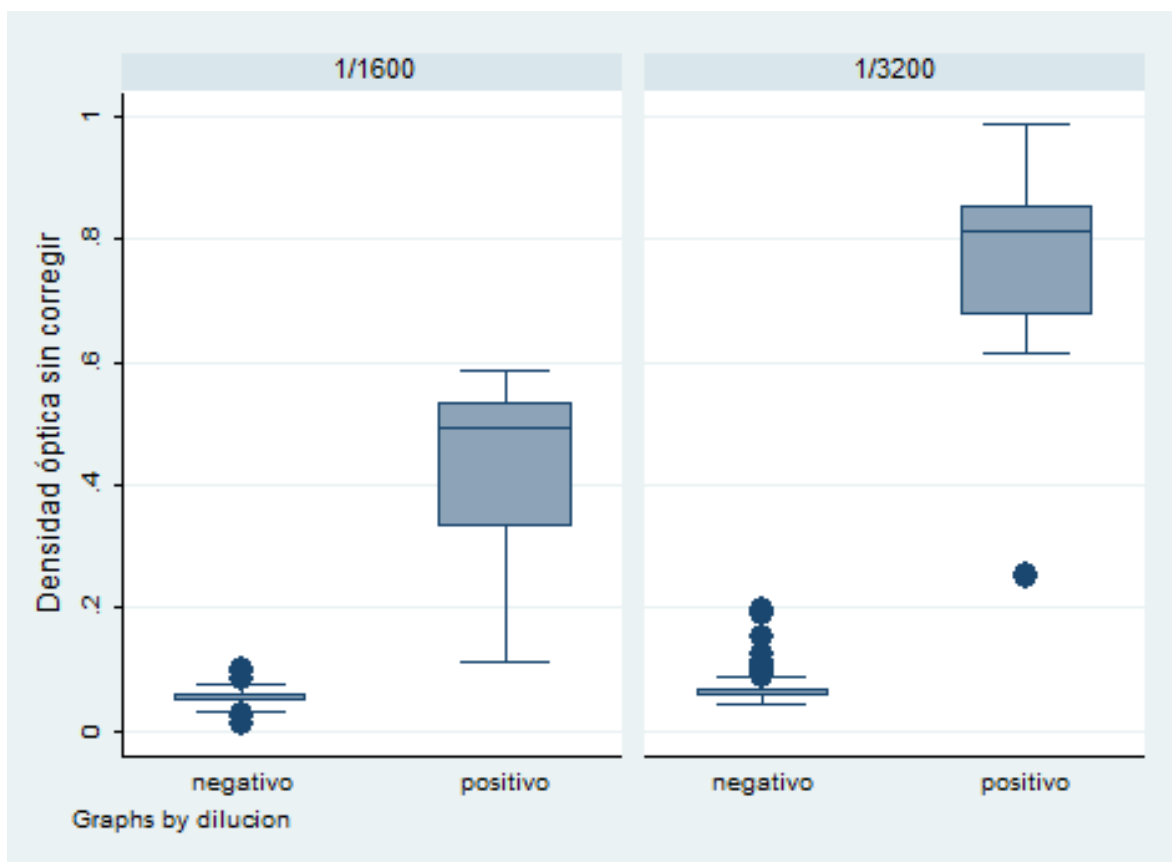
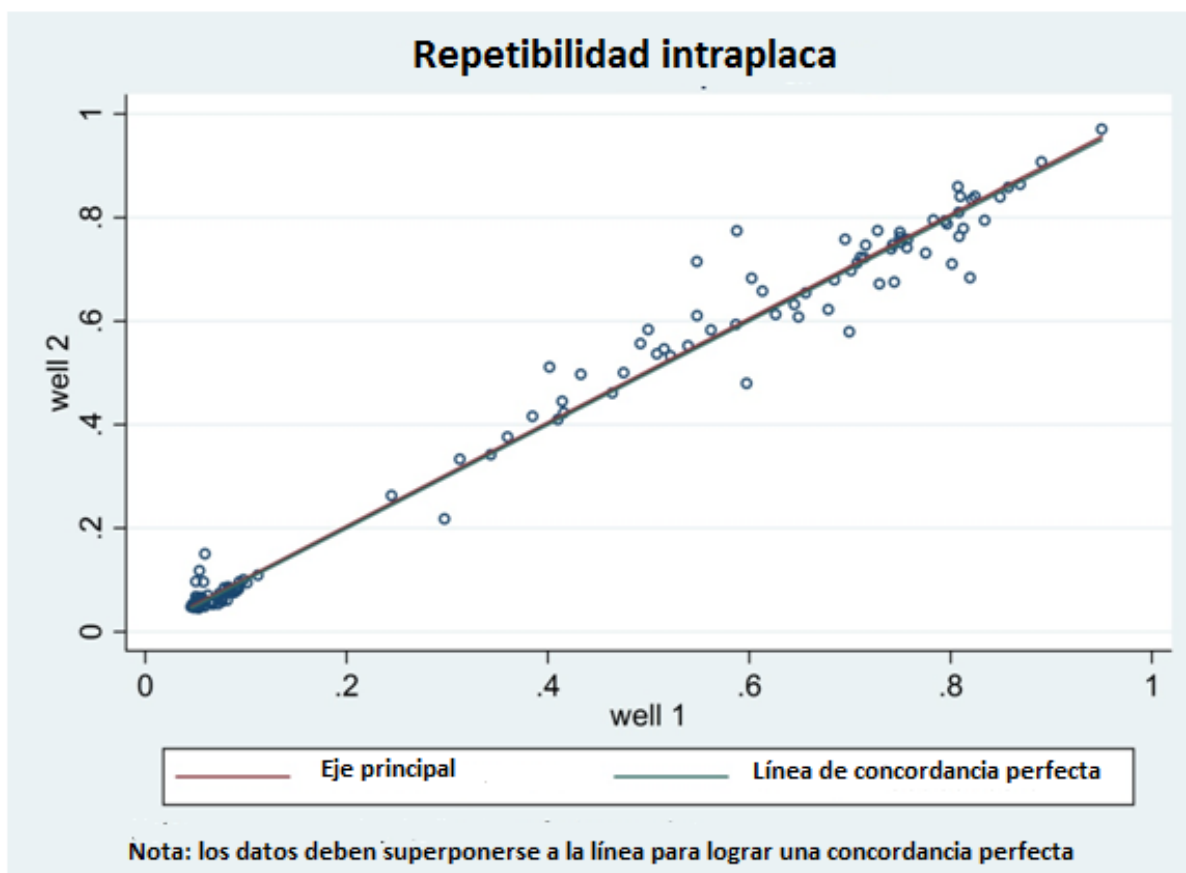


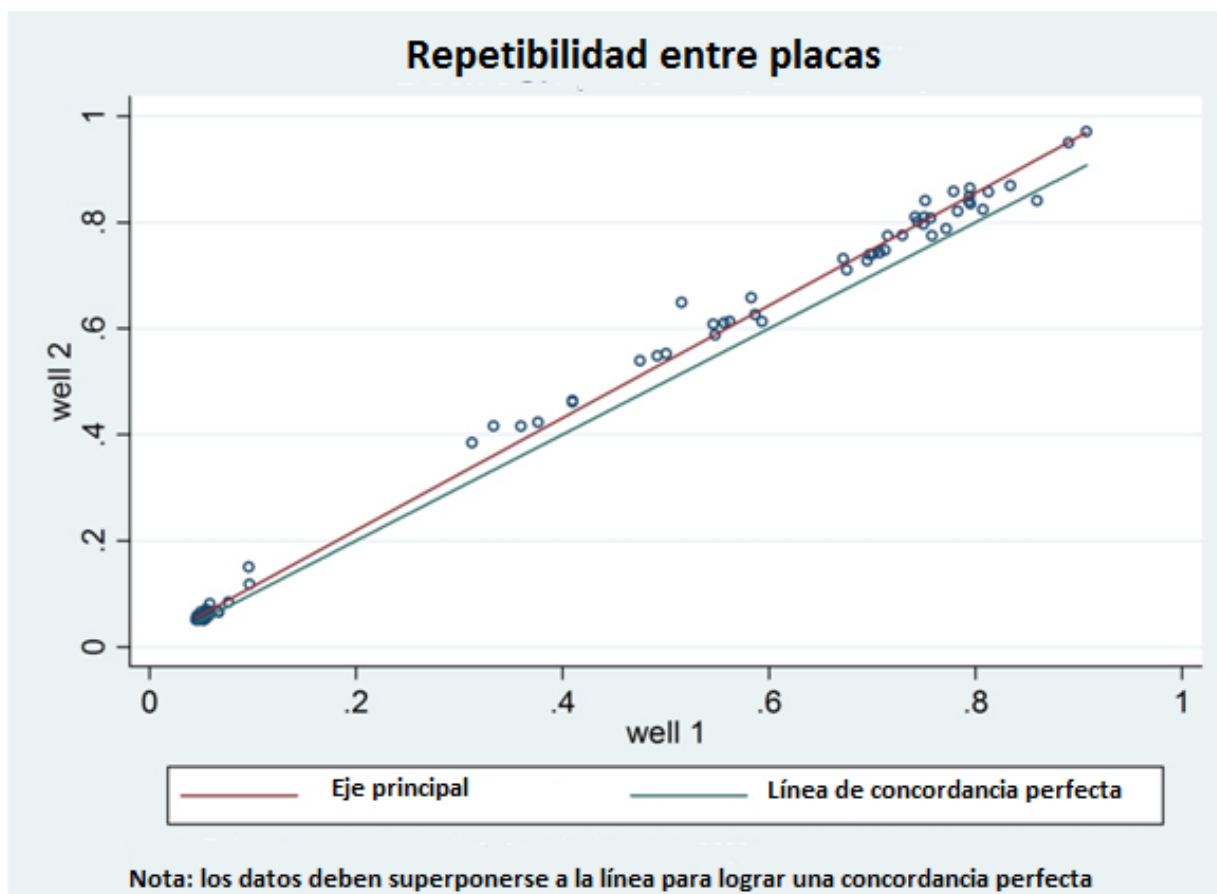
Figura 23. Se muestran los valores de las diluciones del Ag utilizado durante el desarrollo del ELISA. Claramente se observa que en la dilución 1/3200 existe una mayor discriminación (OD) entre el suero positivo y el negativo. La dilución del antígeno 1/3200 fue utilizada posteriormente en el ELISA para controlar los 460 sueros.

6.1.2 Repetibilidad y reproducibilidad

De acuerdo con las premisas establecidas en el manual de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) para determinar la variabilidad dentro del laboratorio se determinó la repetibilidad y reproducibilidad dentro y entre las placas. Los CV estimados para la repetibilidad intraplaca e interplaca no superó el valor indicado, comprendido en un rango de 4,84% a 17,92%. La repetibilidad

dentro y entre de las placas fue de 0,998 (IC del 95% 0,997-0,998) y 0,996 (IC del 95% 0,993 a 0,998), respectivamente (Figura 24 y Figura 25).





Figuras 24 y 25. En el diseño de gráficos se observa la repetibilidad intra e interplaca en el ELISA desarrollado.

6.1.3 Análisis de los sueros

La dilución 1: 3200 de Ag, y un tiempo de incubación de 40 min con el sustrato se utilizó para analizar el panel de 460 sueros diluidos 1:10 y clasificados positivos o negativos por la técnica de IFI. La figura 26 muestra un ensayo de ELISA de los resultados obtenidos.

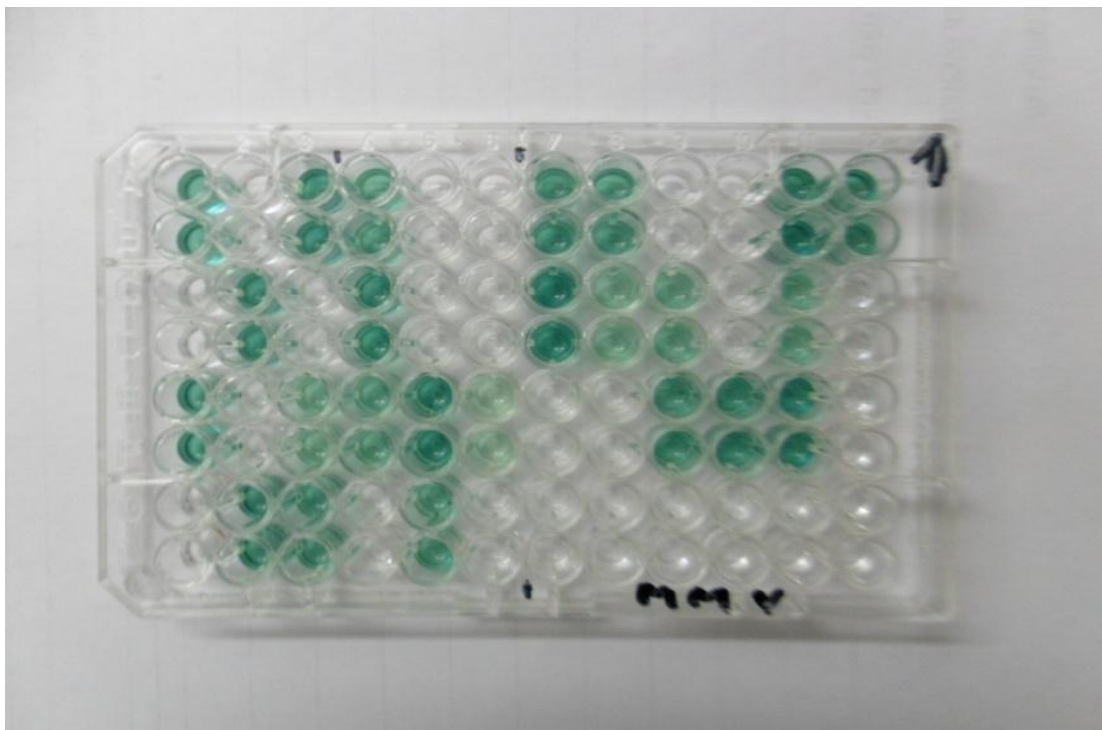


Figura 26. Placa que muestra los resultados que se obtuvieron al realizar un ELISA con diferentes sueros.

La técnica de ELISA indirecto desarrollada mostró una sensibilidad del 100% y 99% de especificidad (Tabla 7). El punto de corte analizado por curva ROC fue de 0,300 (Figura 27).

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de 460 sueros de bioterios convencionales analizados por IFI (técnica “gold standard”) y ELISA indirecto.

Test	ELISA		
	(+)	(-)	Total
IFA (+)	77	0	77
IFA (-)	3	380	383
Total	80	380	460

* (+) = positivo; (-) = negativo

Sensibilidad 100%, Especificidad 99%

Kappa (95 % CI) = 0,97 (0,951-1,000)

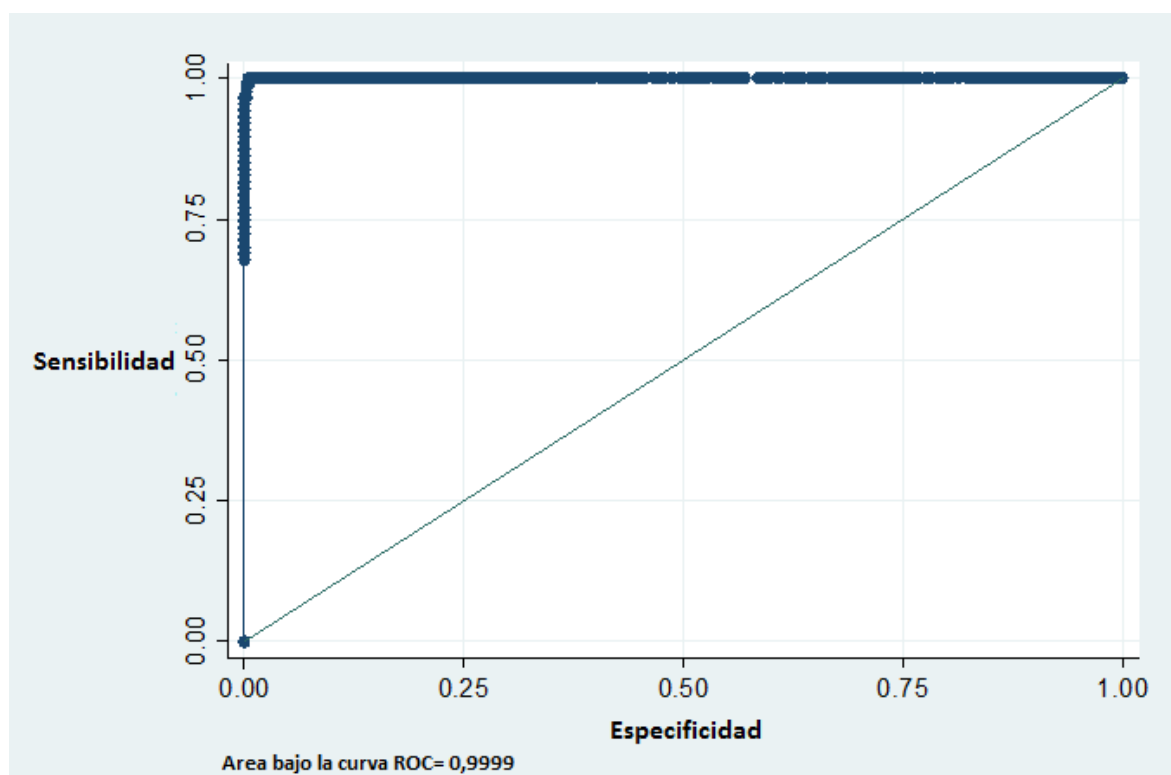


Figura 27. En la gráfica se observan sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA desarrollada.

El 18.75 y el 18.13 % de los sueros analizados fueron determinados positivos por ELISA e IFI, respectivamente.

Todos los sueros también fueron analizados por IFI para la presencia de Ac específicos contra otros patógenos y 53 de ellos fueron positivos para *Mycoplasma pulmonis*, *Corynebacterium kutscheri*, Virus de la hepatitis murina, *Clostridium piliformis* y Car Bacillus, Y 407 sueros fueron negativos para los antígenos mencionados.

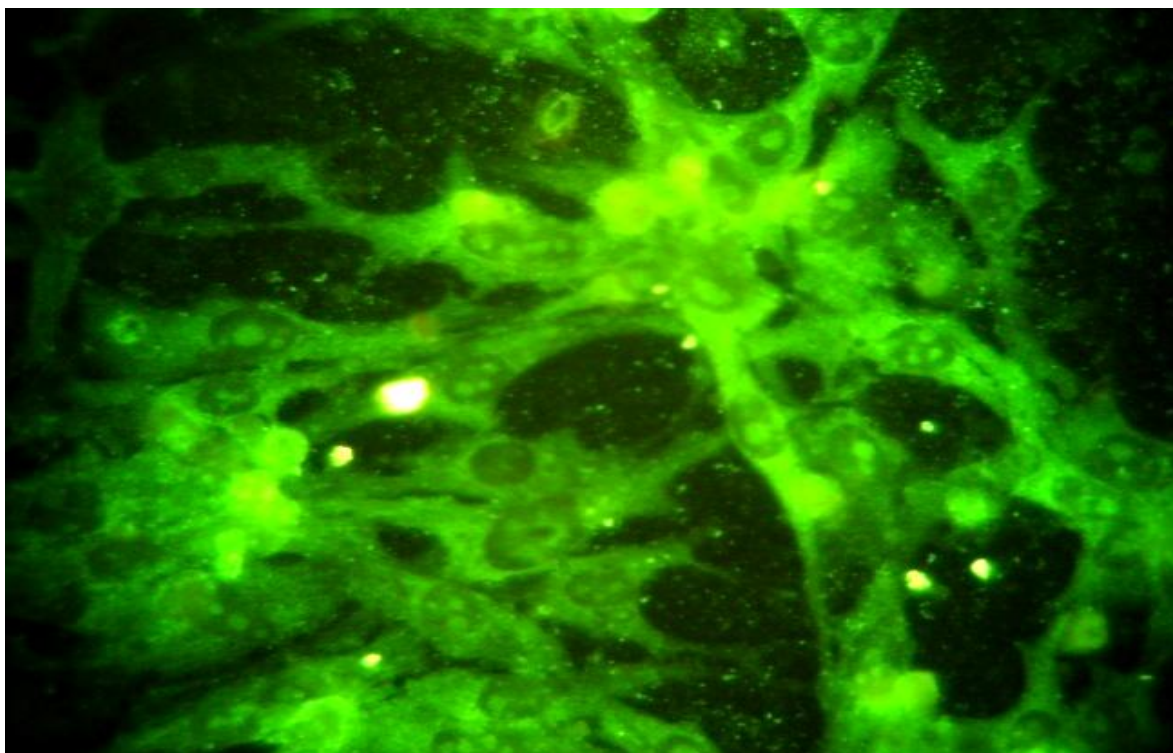


Figura 28. Inmunofluorescencia indirecta positiva para MVM (48 hs pi) en células L929. En estadios tempranos de de infección se observa fluorescencia en el núcleo (se observa en algunos núcleos de la foto) mientras que en estadios posteriores es el citoplasma el que fluoresce (más común de observar por esta técnica) sin límites definidos. En el núcleo se produce una aglomeración (grumos) de la cromatina que se separa en bloques producto del ECP viral. Aumento 400X.

RESULTADOS DE TÉCNICAS MOLECULARES.

6.2 Técnica de PCR

6.2.1 Inoculación experimental del antígeno MVM para la estandarización de la técnica de PCR.

En el análisis por PCR para la detección de MVM en las muestras de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon de los animales inoculados por vía oral se observaron resultados positivos desde el día 7 hasta el día 49 en todas las muestras de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos y hasta el día 42 en muestras de íleon.

En los animales inoculados por vía intraperitoneal se observaron resultados positivos desde el día 7 hasta el día 35 en ganglios linfáticos mesentéricos, en bazo hasta el día 42 y en íleon hasta el día 28.

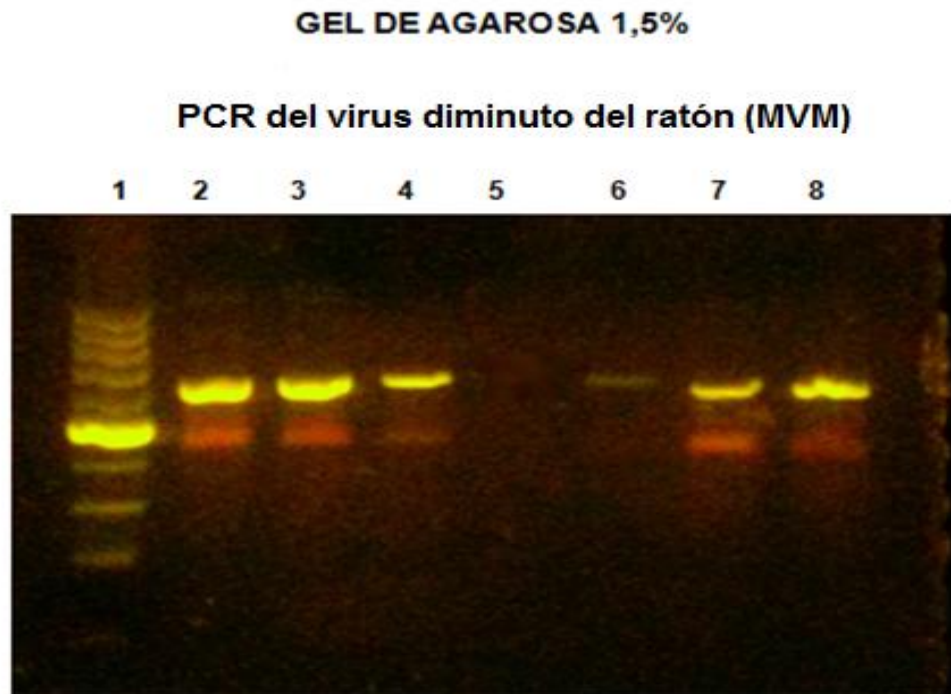
En los animales inoculados por vía endovenosa hubo resultados positivos en muestras de bazo desde el día 7 hasta el día 35, en muestras de íleon hasta el día 7, en ganglios linfáticos mesentéricos hasta el día 28.

En el análisis de las muestras de pool de heces, que se realizó por duplicado (1 muestra conservada a -70°C y la otra a T_a por 7 días) se observaron resultados positivos desde el día 3 hasta el día 27 en los animales inoculados por vía oral y hasta el día 21 en aquellos inoculados por vía intraperitoneal e intravenosa. En todas las muestras positivas que se realizaron por PCR se observó una banda específica de acuerdo con el tamaño esperado (640pb) mientras que no se observó amplificación en el control negativo (Figura 29).

En los resultados del ensayo se observó que el bazo de los ratones fue la muestra preferencial a seleccionar en un control contra MVM por PCR pues hubo resultados positivos en todas las vías de infección y además es un órgano fácilmente identificable y simple de extraer durante la necropsia de los animales, independientemente de la edad de los mismos. Las glándulas de Peter no son fáciles de identificar en las diferentes edades de los ratones y los ganglios

mesentéricos en animales mayores a 8 meses están ocultos por abundante tejido graso que dificulta su ubicación y extracción. También se determinó que la vía a elección para realizar infección experimental es la oral en relación a la duración de la detección viral observada. La vía oro nasal no se eligió en reemplazo de la oral en este ensayo para evitar pérdida del inóculo y consecuente variación de dosis durante la aplicación en los animales. Las muestras de suero (7 de cada caja/vía) y controladas por la técnica de IFI (Tabla 6) resultaron todas positivas (21 sueros) para anticuerpos contra MVM pero mostraron diferencias en la duración de detección de Ac dependiendo de la vía de inoculación utilizada. La tabla 10 muestra la detección de MVM en las muestras durante la experiencia por diferentes vías y tiempo de ocurrencia.

Las muestras de animales control (3 ratones) fueron negativas para MVM durante toda la experiencia demostrando que la vía de diseminación e infección por aire no es prevalente.



Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); Columna 2: Control positivo MVM; Columna 3: muestra n° 1; Columna 4: muestra n° 2; Columna 5: Control negativo; Columna 6: muestra n° 3; Columna 7: muestra n° 4; Columna 8: muestra n° 5.

Figura 29. Gel de agarosa donde se observa una banda específica de acuerdo con el tamaño esperado (640pb) para MVM que se observó en todas las muestras positivas, mientras que no se observó amplificación en el control negativo.



Figura 30. Gel de agarosa donde se observa una banda específica de acuerdo con el tamaño esperado (300pb) para MPV que se observó en todas las muestras positivas, mientras que no se observó amplificación en el control negativo. La muestra n° 1 es positiva para MPV (débil) y MVM al observarse banda en 300 pb y 640 pb respectivamente.

Tabla 8. Muestras controladas por PCR e IFI de animales infectados en forma experimental con MVM por diferentes vías. Entre paréntesis se muestra el número de días con resultado positivo (+) para el virus por PCR (muestra de órganos o heces) o IFI (suero).

Tejido/Vía (días)	Oral	Intraperitoneal	Endovenosa
Bazo	+ (49)	+ (42)	+ (35)
Ileon (Placa de Peyer)	+ (42)	+ (28)	+ (7)
Ganglios mesentéricos	+ (49)	+ (35)	+ (28)
Pool de heces (por duplicado)	+ (27)	+ (21)	+ (21)
Suero	+ (35)	+ (28)	+ (28)

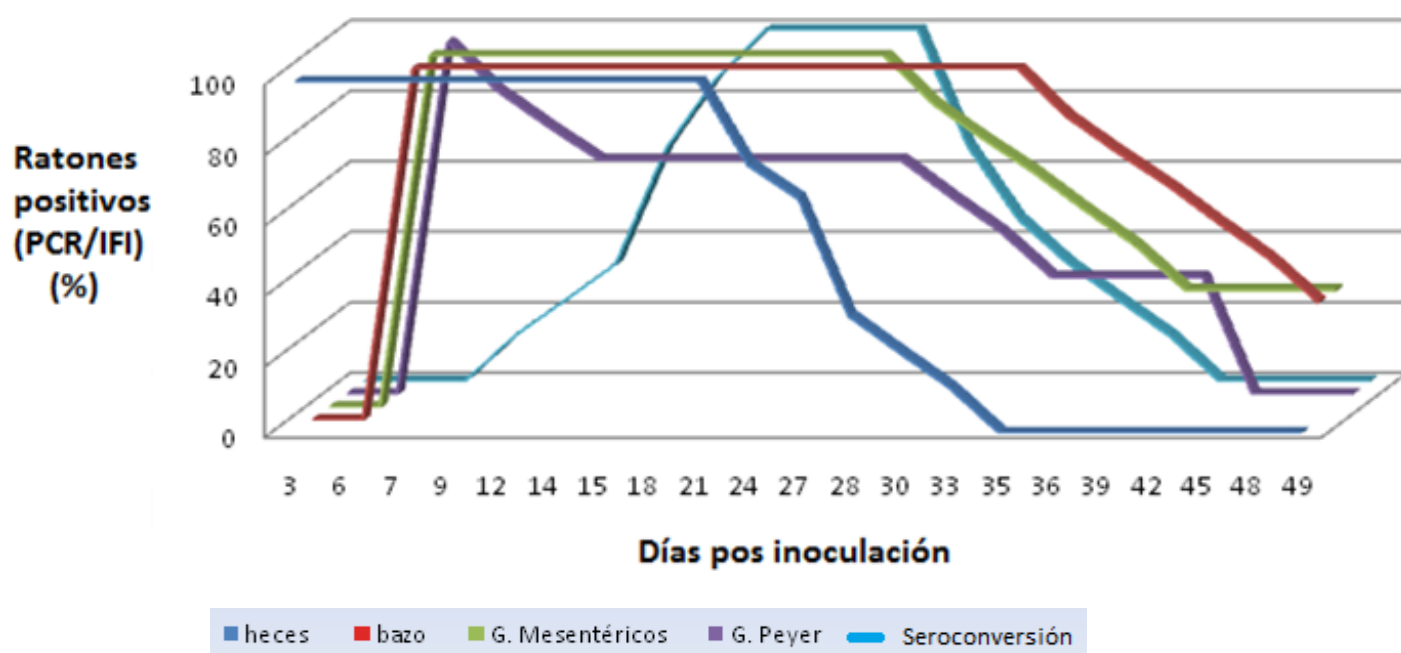


Figura 31. Inoculación experimental en ratones BALB/c. En la gráfica se observa el derramamiento viral (muestra de pool de heces por PCR), la seroconversión (sueros controlados por IFI). También se observa la variación en la detección de MVM en bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y glándulas de Peter (muestras controladas por PCR).

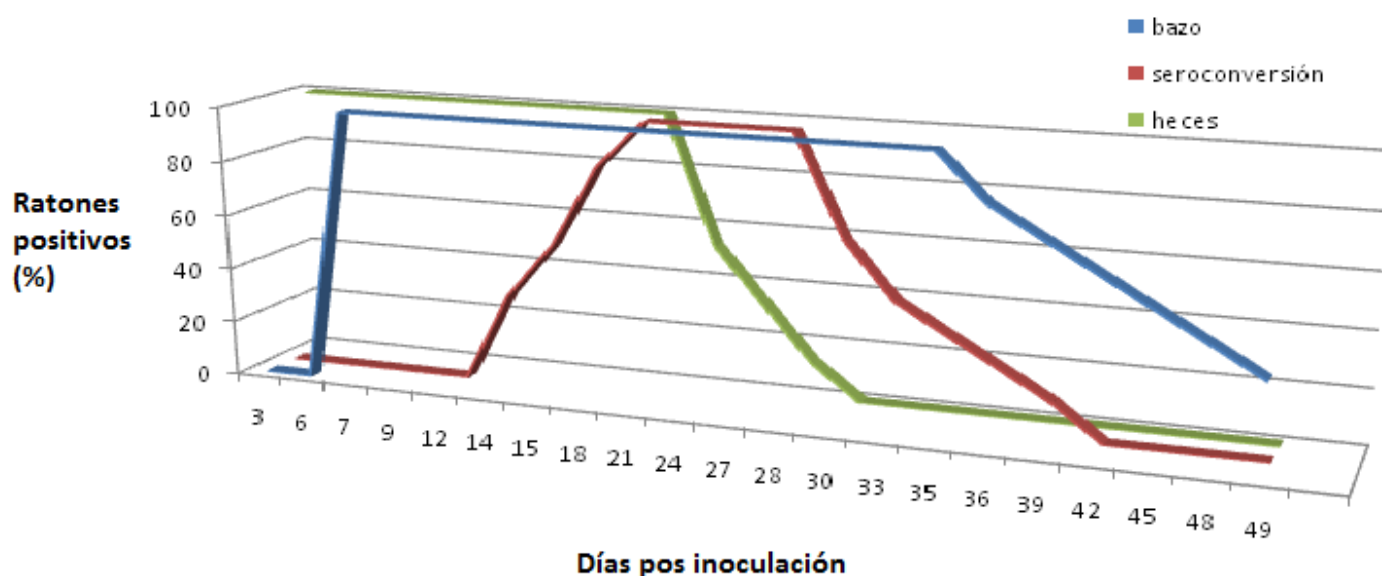


Figura 32. Inoculación experimental en ratones BALB/c. En la gráfica se observa la detección temprana de MVM (a los 3 días) y el posterior descenso del derramamiento viral (muestra de pool de heces por PCR) a medida que la seroconversión aumenta y llega al punto máximo (sueros controlados por IFI). También se observa la variación en la detección de MVM en Bazo (muestras controladas por PCR) inclusive hasta el final de la experiencia (día 49).

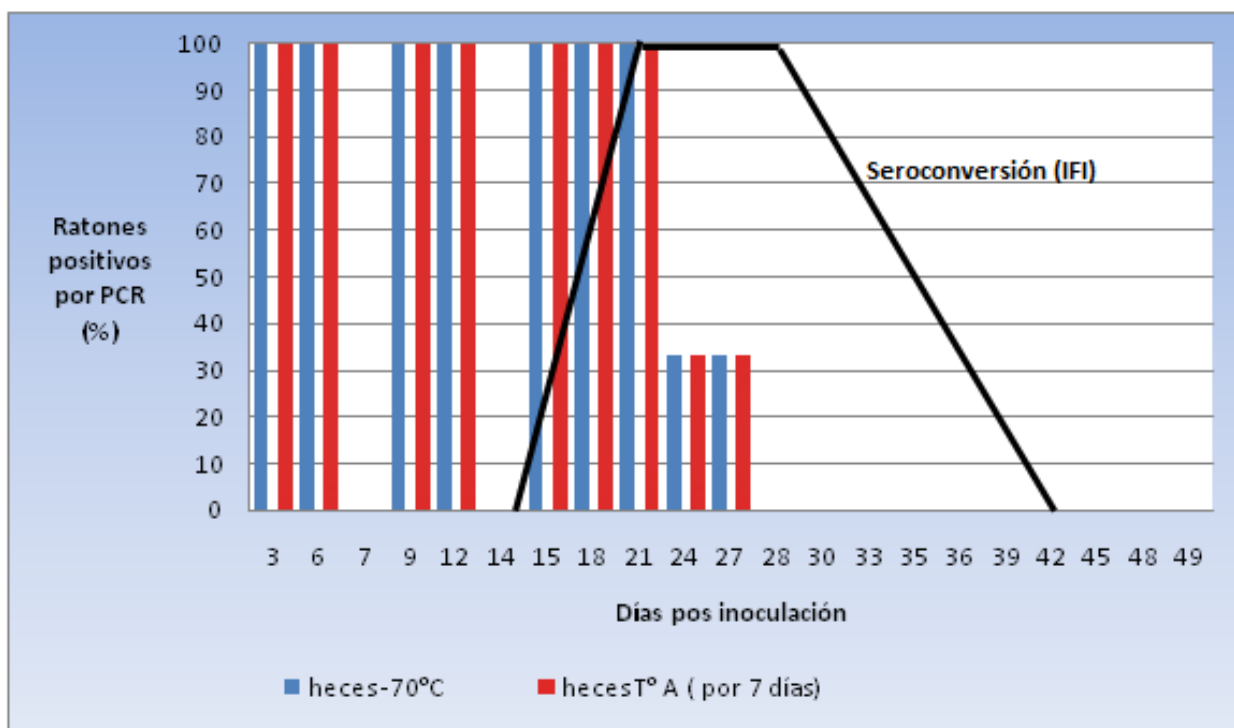


Figura 33. En la figura se observa la estabilidad de MVM en el ambiente al comparar los resultados de detección viral (PCR) en las muestras de heces conservadas a -70°C y muestras que se dejaron a T_a por 7 días antes de procesarlas. Se observa también el descenso del derramamiento viral en los ratones cuando asciende (trazo color negro) el número de animales seropositivos por IFI.

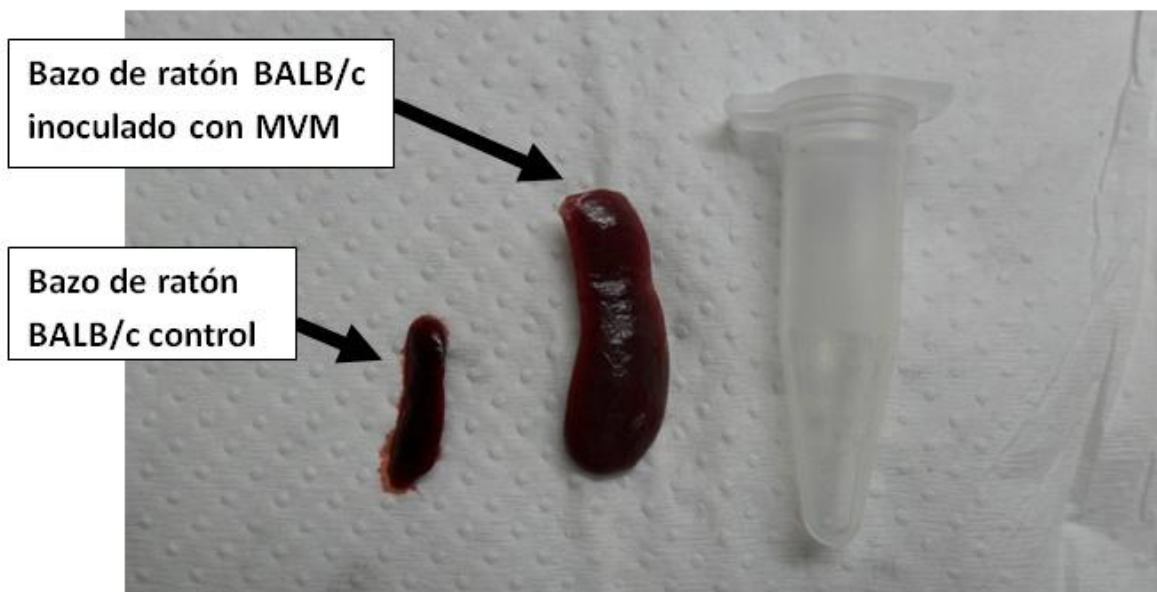


Figura 34. Esplenomegalia (derecha) observada en ratones BALB/c luego de una inoculación experimental con MVM por vía intraperitoneal. El control por PCR de una muestra del bazo fue positivo para MVM. Bazo de ratón control (izquierda) fue negativo para MVM.

6.2.2 Control y prevalencia de MVM mediante la técnica de PCR

Con los cebadores diseñados se logró repetibilidad y especificidad de las ampliaciones. De las muestras de las 46 instituciones estatales y privadas de Argentina analizadas se encontraron: 17 resultados positivos para MVM y 13 para MPV. Hubo 2 muestras con resultados positivos para MPV y negativos para MVM, mientras que 6 muestras fueron positivas para MVM y negativas para MPV. Hubo 11 instituciones (biotérios) positivas para ambos virus (Tabla 9).

De las muestras de 460 bazos de ratones, 109 muestras resultaron positivas para MVM y 72 para MPV (Tabla 12) que se corresponden con 22 instituciones, de las cuales 19 poseen colonias de ratones positivas para MVM y 15 positivas para MPV (tabla 13). La prevalencia para MVM ($n=460$) por PCR fue de 23,71%.

Tabla 9. Tabla indicativa de los resultados de los controles de pool de heces (n=46) por PCR (positivos y negativos) para MVM y MPV. Cada muestra de pool de heces se corresponde con un bioterio de ratones.

	Bioterio (Pool heces) MVM POS	Bioterio (Pool heces) MVM NEG	Bioterio TOTAL
Bioterio (Pool heces) MPV POS	11	2	13
Bioterio (Pool heces) MPV NEG	6	27	33
TOTAL	17	29	46

Tabla 10. Tabla indicativa de los resultados de los controles de bazos (n=460) por PCR (positivos y negativos) para MVM y MPV.

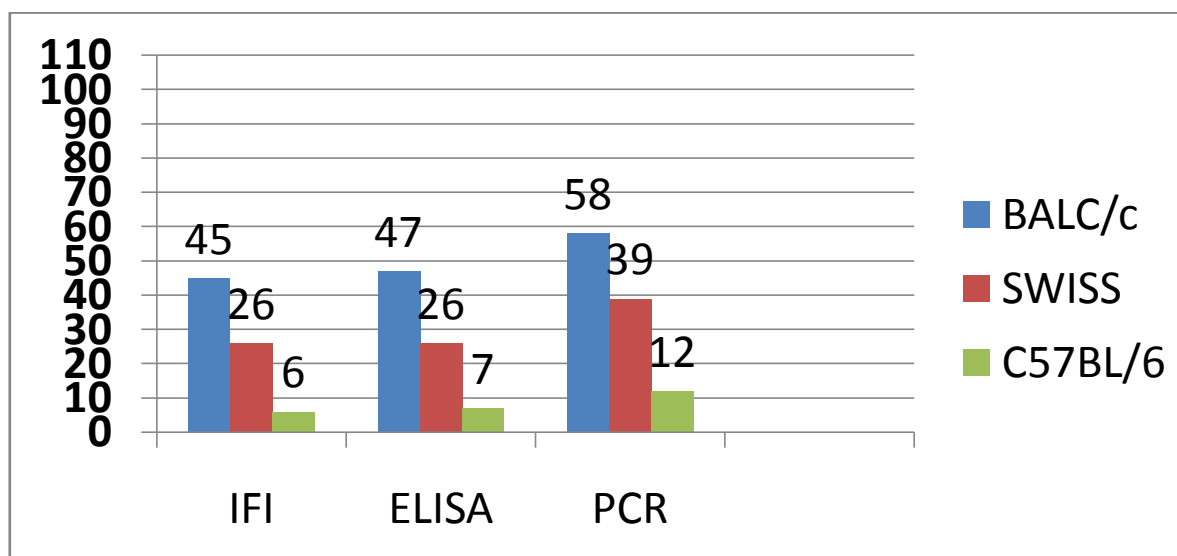
	Bazos MVM POS	Bazos MVM NEG	Bazos TOTAL
Bazos MPV POS	67	5	72
Bazos MPV NEG	42	346	388
TOTAL	109	351	460

Tabla 11. Tabla indicativa de los resultados de los controles de bazos (positivos y negativos) para MVM en relación a los 46 bioterios (n=46) por PCR para MVM y MPV. La muestra de cada bioterio son 10 animales/bazos y se considera bioterio/colonia positiva (MVM y/o MPV) si uno o más bazos dan positivo por PCR.

	Bioterio (bazos) MVM POS	Bioterio (bazos) MVM NEG	Bioterio TOTAL
Bioterio (bazos) MPV POS	12	3	15
Bioterio (bazos) MPV NEG	7	24	31
TOTAL	19	27	46

Se observó que la prevalencia de MVM por IFI fue 18,13 y ELISA 18,38% es decir resultados similares encontrados en las técnicas serológicas empleadas, mientras que por técnicas moleculares (PCR) fue de 23,71%.

Figura 35. Resultados de ratones de diferentes cepas positivos para MVM según la técnica utilizada. Número de animales positivos a MVM (N: 460) IFI: 77 (+); ELISA: 80 (+); PCR: 109 (+).



N:460 animales (234 BALB/c ; 116 SWISS; 110 C57BL6).

En la Tabla 12 se muestran los resultados de prevalencia para MVM según la técnica utilizada.

Tabla 12. Resultados de prevalencia para MVM en base a la técnica utilizada. Se colocaron los resultados de todas las técnicas para una mejor comparación de los mismos. Se observa que la prevalencia es mayor (23,71 %) por PCR debido a la sensibilidad de la técnica en comparación con las técnicas serológicas.

	Porcentaje de Prevalencia	Error estándar	Intervalo de Confianza (95%)	
PCR				
Negativo	76,29 %	1,95	71,98 %	79,67 %
Positivo	23,71 %	1,95	20,32 %	28,01 %
ELISA				
Negativo	81,62 %	1,78	77,74 %	84,75 %
Positivo	18,38 %	1,78	15,24 %	22,25 %
IFI				
Negativo	81,87 %	1,76	78,41 %	85,33 %
Positivo	18,13 %	1,76	14,66 %	21,58 %

Proporción de la estimación

Número de observados= 460

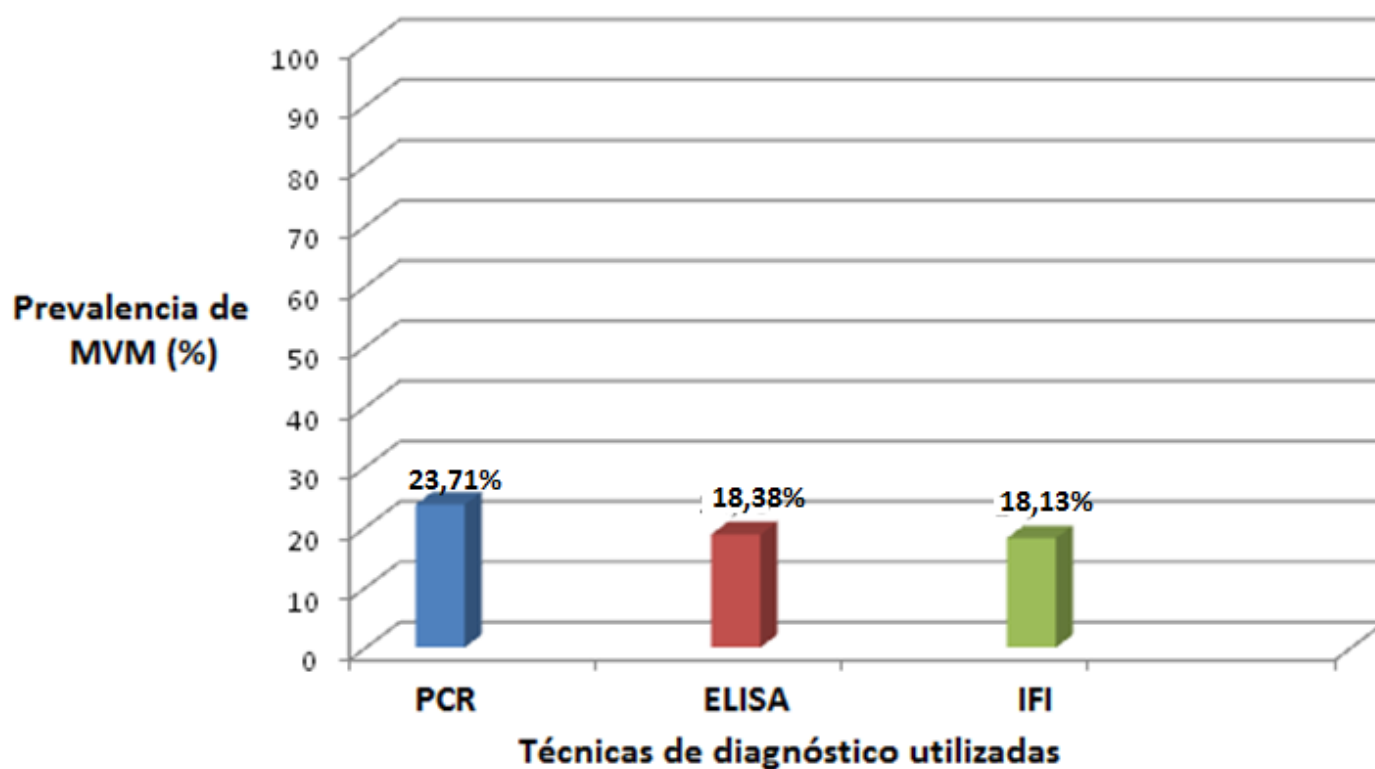


Figura 36. Prevalencia de MVM en los bioterios controlados según la técnica utilizada (IFI, ELISA y PCR) con un n=460.

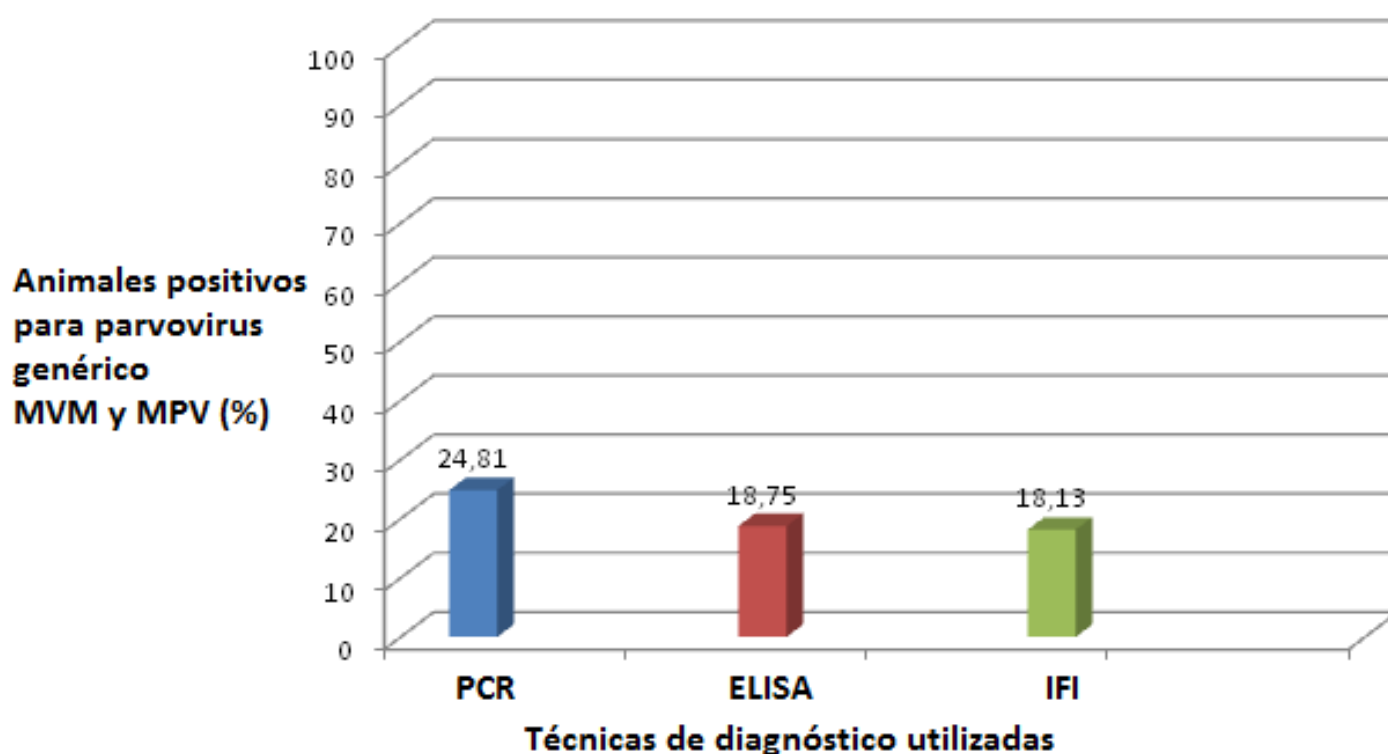


Figura 37. Comparación de resultados positivos para parvovirus genérico (PAR=MVM y MPV) en los bioterios controlados según las técnicas de IFI, ELISA y PCR con un n=460. Se observa que la prevalencia por PCR Y ELISA se incrementa debido a los animales que fueron positivos a MPV y negativos a MVM.

6.3 Estudio de las condiciones higiénico-sanitarias de las instituciones evaluadas.

Además de establecer la distribución geográfica en el país de las instituciones o bioterios investigados (ítem 5.10) también se realizó un estudio de las condiciones higiénico-sanitarias y del sistema de barreras con que cuenta cada bioterio de acuerdo con el sistema de barreras sanitarias con que cuentan, las instalaciones se clasificaron en tres categorías: A, B y C.

Siendo la A la que cuenta con más barreras sanitarias; la B que no posee sistemas ventilados de alojamiento para los animales y la C que además carece de procedimientos para desinfección y esterilización de insumos, lo cual se

resume en la Tabla 13. De las 46 instituciones evaluadas 2 pertenecen al grupo A lo que representa el 4,34 % del total, 31 al grupo B con 67,41 % y 13 al grupo C con 28,25 % respectivamente (Figura. 38).

Tabla 13: Barreras sanitarias evaluadas en los bioterios seleccionados. Se agruparon en Grupo A, B y C en base a la presencia-ausencia de barreras sanitarias. La primera columna corresponde a la lista de barreras sanitarias necesarias para el mantenimiento de animales SPF.

Bioterio SPF		Bioterio convencional		
SPF	Grupo A	Grupo B	Grupo C	
Desinfección periódica	x	x	x	
Aislamiento Arquitectónico	x	x	x	
Control de Temperatura	x	x	x	
Esterilización de materiales e insumos	x	x		
Control sanitario	x	x	x	
Cuarentena	x	x	x	
Racks ventilados (HEPA)	x			
Ventilación y filtración de aire (HEPA) del sector de producción animal				
Uso de duchas sanitarias				
Entrenamiento de personal técnico	x	x	x	
Uso de protocolos de tareas (POES)	x	x	x	

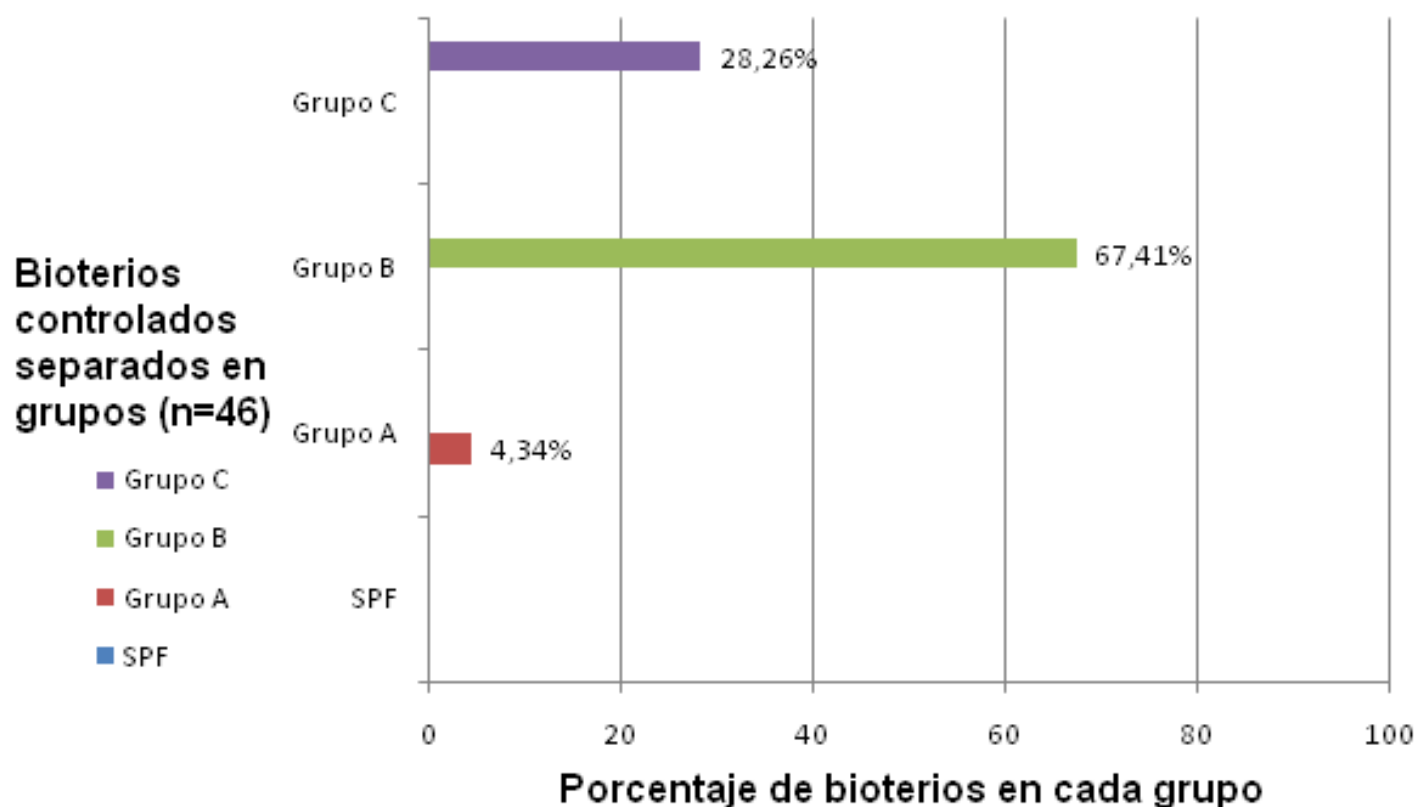


Figura 38: Se observa el porcentaje de bioterios analizados y discriminados en grupos en base a las barreras sanitarias que poseen. De un total de 46 bioterios (13 bioterios del Grupo C, 31 del Grupo B y 2 del Grupo A). No se encontraron bioterios con un sistema de barreras sanitarias necesario para la producción de animales SPF. De manera que todas las muestras que se estudiaron en este trabajo provinieron de bioterios convencionales.

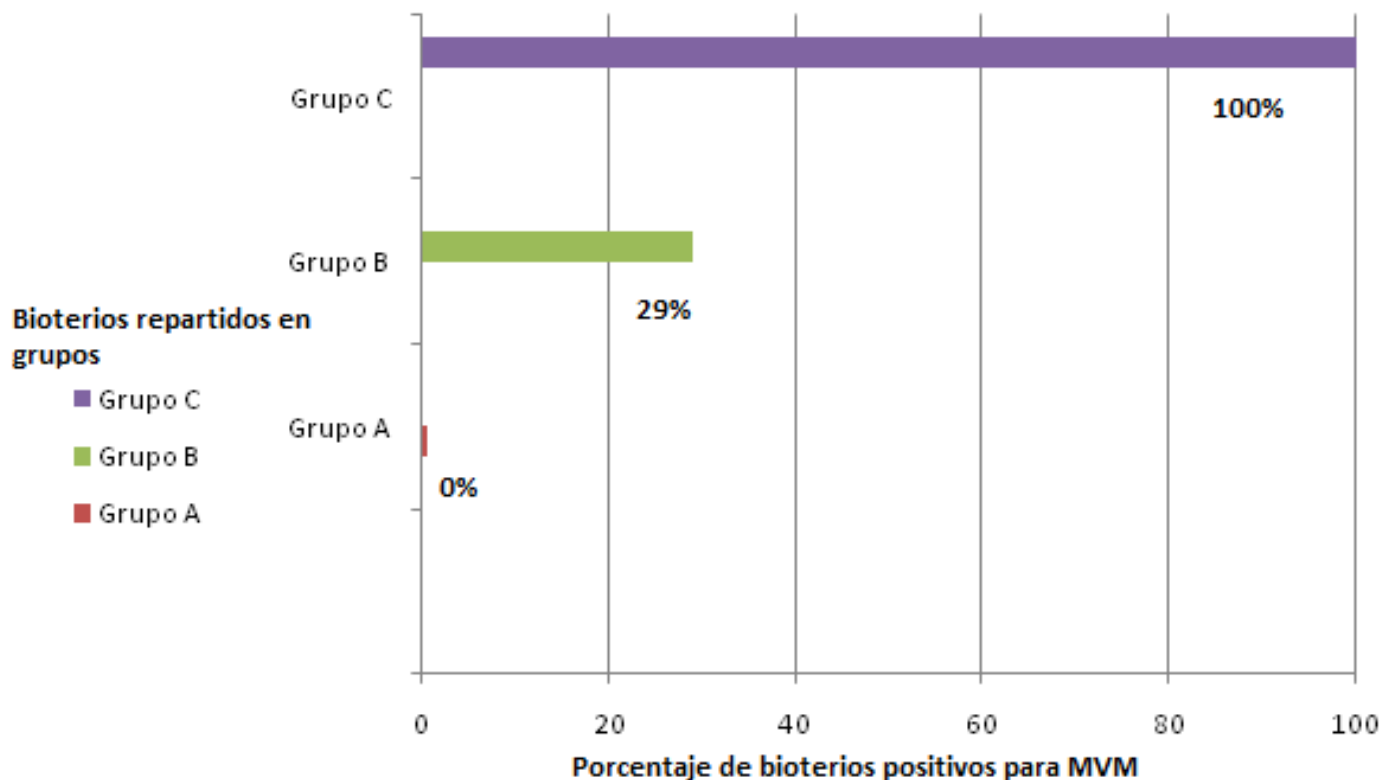


Figura 39. Porcentaje de bioterios positivos para MVM siendo 13 bioterios del Grupo C y 9 del Grupo B. El Grupo A no tuvo resultados positivos para MVM.

6.4 Investigación de la interferencia de MVM en líneas tumorales utilizadas en investigación.

En los 4 grupos se observaron los siguientes resultados:

Grupo A (inoculados con T-A549 y MVM): 2 animales desarrollaron un escaso crecimiento tumoral de un tamaño de 4x2 mm y los restantes no desarrollaron las células tumorales inoculadas. Durante la necropsia de todos los animales no se observó lesiones de carácter diagnóstico. También 2 animales presentaron esplenomegalia y microscópicamente el tejido esplénico presentó una correcta distribución de pulpa roja y pulpa blanca. En la necropsia de pulmón no

se observó áreas con atelectasia, congestión y edema. No se encontró células en el espacio subcapsular.

Mediante la técnica de PCR se realizó un control de tejido intestinal (íleon), bazo y ganglios mesentéricos para la detección de MVM y se encontró resultados positivos en las muestras de todos los animales.

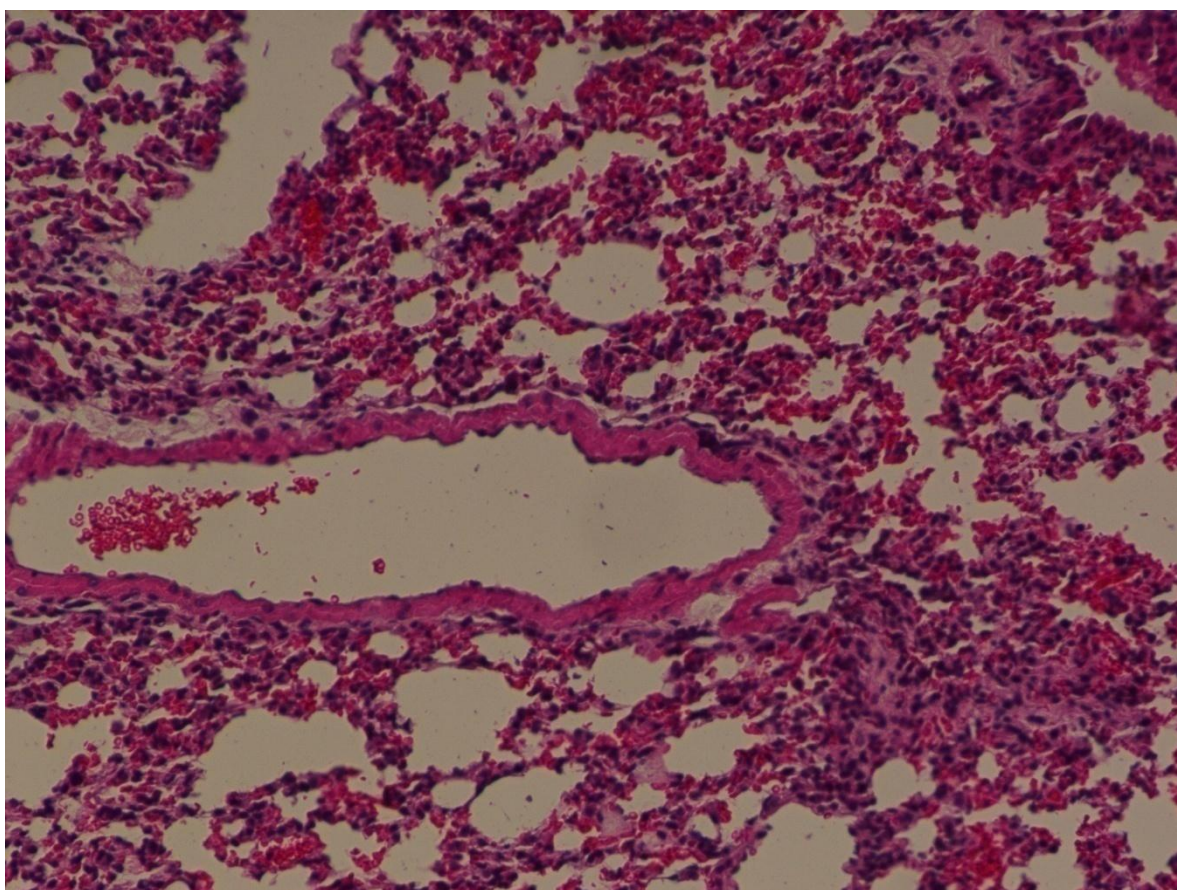


Figura 40. Corte de pulmón de ratón *nude* (inoculado con T-A549 y MVM). No se observan lesiones de origen tumoral. Aumento 10X.

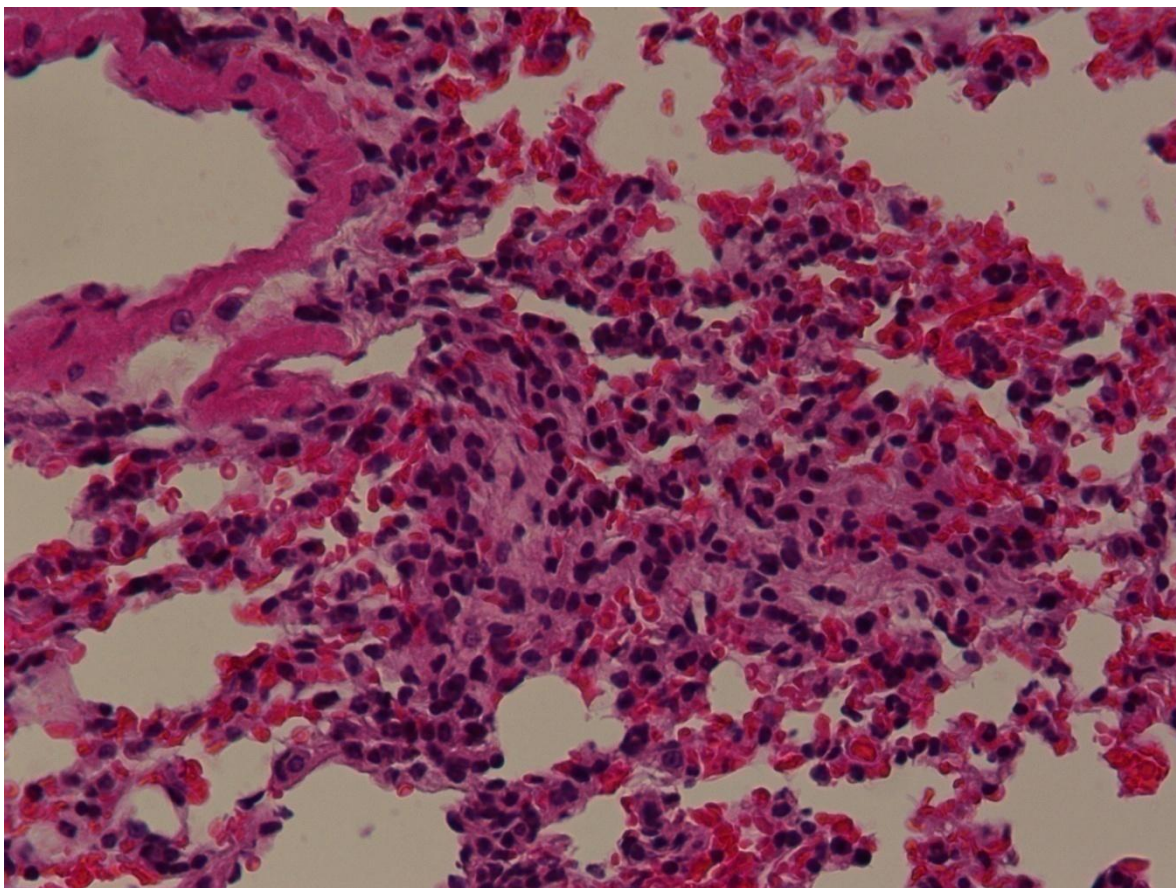


Figura 41. Corte de pulmón sano de ratón *nude* (inoculado con T-A549 y MVM). En detalle células del tejido areolar. No se observan lesiones de origen tumoral. Aumento 20X.

Grupo B (inoculados con T-A549): En el examen macroscópico de todos los animales se observó un desarrollo tumoral a partir del trasplante realizado. Luego de la eutanasia se realizó una necropsia y se observó el pulmón con áreas de atelectasia, congestión y edema abundante. También se observó un infiltrado neoplásico, bien delimitado y medianamente encapsulado. El mismo estaba formado por múltiples lóbulos separados por un fino patrón fibrovascular. En algunos lóbulos se observó áreas centrales de necrosis. A mayor aumento, se observó células grandes redondas a poliédricas, con macrocariosis y anisocariosis. Múltiples nucléolos evidentes, núcleos vesiculosos y citoplasma amplio. En el bazo se observó tejido esplénico con correcta distribución de pulpa

roja y pulpa blanca y sobre la cápsula del órgano se observó un infiltrado neoplásico compuesto por células epiteliales.

Mediante la técnica de PCR se realizó un control de tejido intestinal, bazo y ganglios mesentéricos para la detección de MVM y se encontró resultados negativos en las muestras de todos los animales.

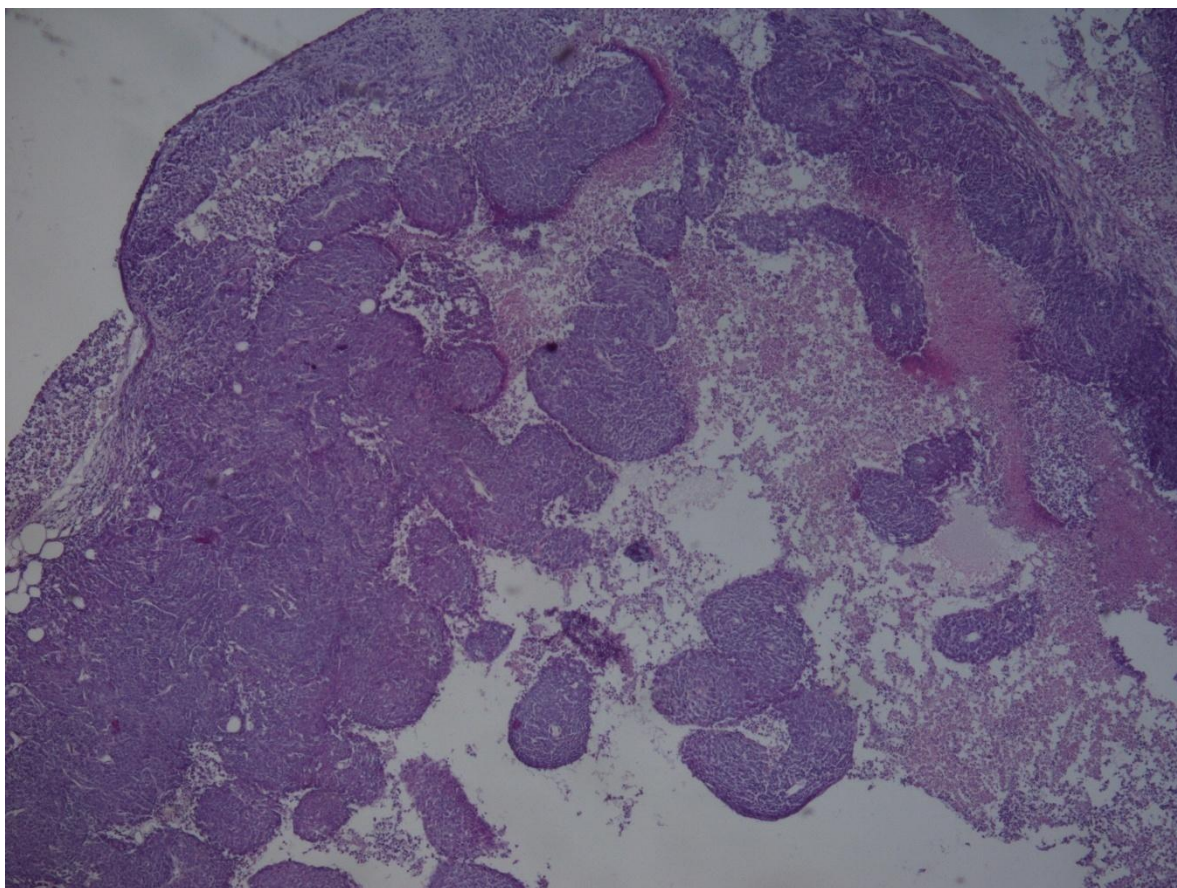


Figura 42. Toma de muestra de pulmón. Corte de tejido tumoral (A549) de un infiltrado neoplásico en ratones *nude* y tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento 10 X.

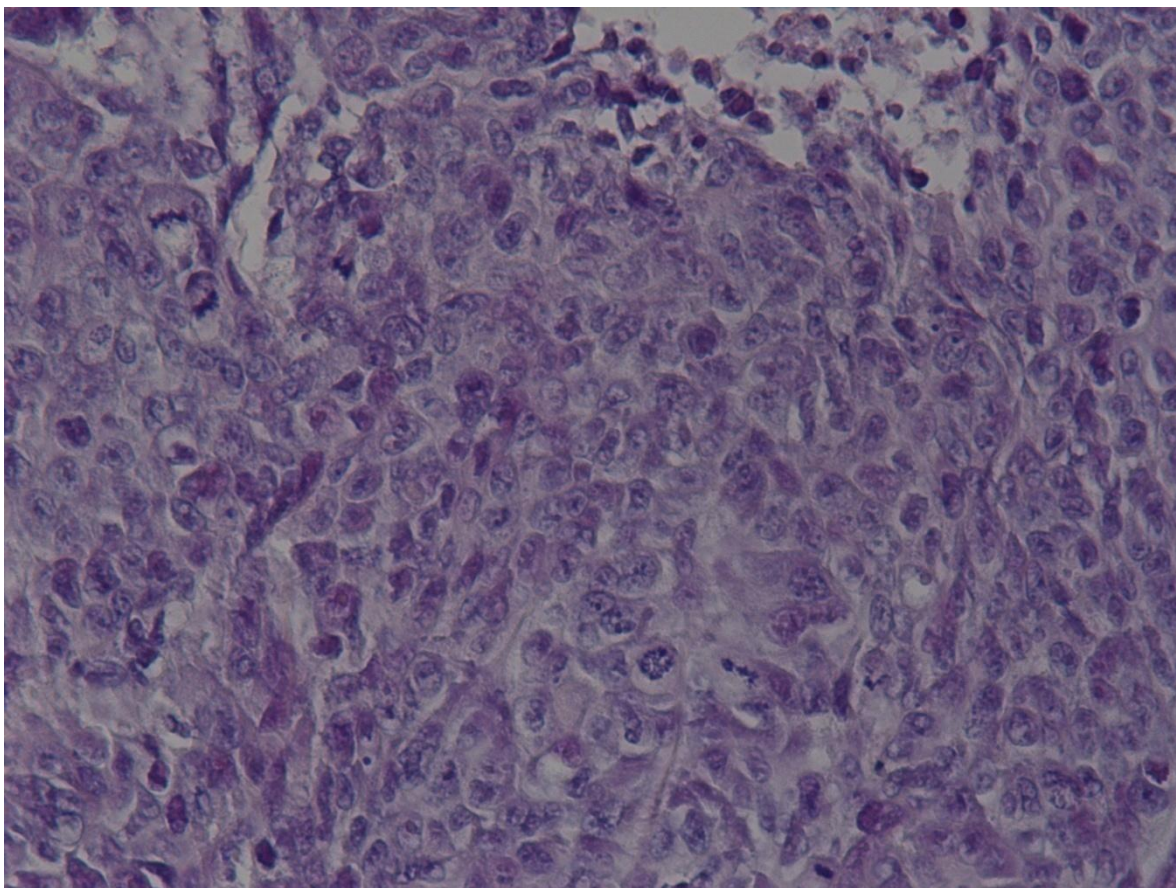


Figura 43. Toma de muestra de pulmón. Corte de tumor y detalle de células neoplásicas con tinción de Hematoxilina-Eosina. Aumento 40X.

Grupo C (inoculados con MVM): Durante la necropsia se encontró que 3 animales desarrollaron esplenomegalia aunque el tejido esplénico poseía una correcta distribución de pulpa roja y pulpa blanca. El espacio subcapsular se encontró sin células.

Mediante la técnica de PCR se realizó un control de tejido intestinal, bazo y ganglios mesentéricos para la detección de MVM y se encontró resultados positivos en las muestras de todos los animales.

Grupo D (grupo control): En la necropsia de los animales no se observó lesiones de carácter diagnóstico. En el bazo se observó tejido esplénico con una correcta distribución de pulpa roja y pulpa blanca.

Mediante la técnica de PCR se realizó un control de tejido intestinal, bazo y ganglios mesentéricos para la detección de MVM y se encontró resultados negativos en las muestras de todos los animales.

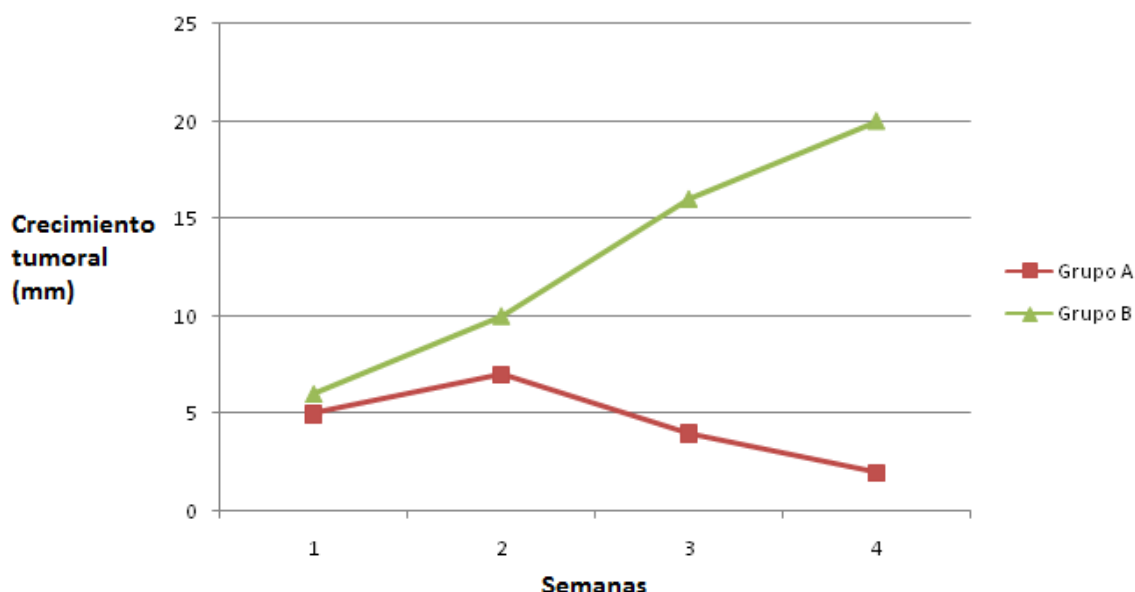


Figura 44. En la gráfica se observa el desarrollo tumoral durante el transcurso de las semanas posteriores al trasplante del mismo. En el Grupo A el tumor tuvo un leve crecimiento inicial y luego comenzó a reducirse como consecuencia de la infección de los animales con MVM. En el Grupo B el tumor tuvo un desarrollo normal.

Los resultados de las pruebas de PCR para la investigación de contaminación con parvovirus genérico y MVM de las líneas celulares de osteosarcoma humano (MG-63 CRL 1427) y la de adenocarcinoma de colon colorectal humano (HT-29 HTB-38) que son trasplantadas en forma rutinaria en las instalaciones del LAE en cepas de ratones inmunodeficientes N: NIH(S)- Foxn1^{nu} y BALB/c-CAN.Cg-Foxn1^{nu} no mostraron resultados positivos de contaminación y permitió seguir con las investigaciones y el desarrollo de las tareas proyectadas en el Programa de Incentivos de la UNLP que se realiza actualmente en las instalaciones del LAE.

Discusión

La presencia de agentes infecciosos representa un serio problema en las colonias de animales de laboratorio. Algunos de ellos, como ya fue descrito, producen signos clínicos y otros producen infecciones asintomáticas. El MVM y el MPV son dos agentes altamente prevalentes y generalmente son monitoreados por detección de Ac en el huésped (Kunita y col., 2006). La técnica de IHA fue la primera en ser usada para la detección de Ac pero posee la desventaja de que es necesario una gran cantidad de Ag para realizarla. Es por eso que la IFI y el ELISA son las técnicas más utilizadas actualmente (Ball-Goodrich y col., 2002). Para la IFI se utilizan células infectadas con MVM y por lo tanto se detectan Ac contra las proteínas NS y las VP de manera que no se puede diferenciar si los animales están infectados con MVM o con MPV ya que las proteínas NS están conservadas en ambos virus. Los Ag usados en los ELISA convencionales y producidos con partículas virales completas, contienen gran cantidad de proteínas VP y pequeñas cantidades de NS. La IFI es una técnica específica y útil para analizar cantidades pequeñas de muestras, sin embargo el ELISA es una buena técnica de *screening* y puede ser utilizada para control de rutina de gran número de muestras (Kunita y col., 2006).

Para esta tesis el primer objetivo que se planteó fue desarrollar un ELISA para la detección de Ac contra MVM y así determinar la prevalencia de infecciones por este virus en colonias de ratones de Argentina.

Se desarrolló un Ag rendidor y muy fácil de obtener utilizando la cepa MVMp y células BHK-21 a diferencia de otro Ag producido con células L929. Básicamente se seleccionó esta línea celular debido a que las células desarrollaban más rápidamente en las primeras 12 hs de cultivo que las células L929. El método de obtención de los viriones a partir de cultivos celulares infectados se basó en centrifugaciones y no fueron necesarias altas velocidades de centrifugación. El mejor Ag se logró cuando las células fueron infectadas simultáneamente con el virus al colocarlas en un nuevo frasco luego de la remoción con tripsina-EDTA, seguramente porque la mayoría de ellas se encontraban en fase S del ciclo de división celular, requerimiento indispensable

para el mejor crecimiento de los parvovirus. En los últimos años, otros ELISA alternativos fueron desarrollados usando proteínas VP y NS recombinantes para poder diferenciar MVM de MPV. Sin embargo algunos autores opinaron que los ELISA con Ag basado en NS recombinantes perdían sensibilidad y propusieron una combinación de las proteínas recombinantes VP2 y NS1 de MVM con VP2 de MPV (Livingston y col., 2002; Kunita y col., 2006; Filipovska-Naumovska y col., 2010). El interés de realizar en este trabajo de tesis un Ag a partir de cultivos celulares infectados se basó principalmente en el hecho de que la tecnología de producción de proteínas recombinantes no siempre es reproducible en laboratorios de diagnostico virológico clásico. Es por eso que el Ag aquí desarrollado, al usarse con células infectadas y etapas de centrifugación, resultó sencillo y en menos de 72 hs pudo ser producido utilizando metodología clásica en virología. Posteriormente, la técnica de ELISA resultó ser específica, sensible y útil para analizar un gran número de muestras.

Al introducir en el análisis dos sueros control positivos a MPV se observó que estos también fueron detectados positivos, probablemente debido a reacción cruzada ya que en el Ag realizado con viriones siempre contiene pequeñas cantidades de proteínas NS responsables de este resultado (Kunita y col., 2006). Para confirmar estos resultados deberían ser analizadas un mayor número de muestras comparativamente con un Ag específico para MPV.

Los resultados obtenidos con el ELISA desarrollado (18,38% de animales positivos para MVM) son consistentes con otros previamente reportados (Laborde y col., 2011) y probablemente son el resultado de la falta de implementación de barreras en la mayoría de los bioterios convencionales. Comparativamente, en Estados Unidos de América y en algunos países de Europa, el porcentaje de animales positivos es menor (1-3 y 2-8%, respectivamente), seguramente porque la mayoría de las instituciones produce animales SPF (Pritchett-Corning y col., 2009; Janus y Bleich, 2012). Por el contrario la prevalencia para MVM que informa Brasil es más alta (47,15%) (Giglioli., 2003). Sin embargo hay que considerar además que otros autores sugieren que la seroprevalencia es variable entre las

diferentes cepas murinas (Jacobson, 1998; Kunita y col., 2006; Filipovska-Naumovska y col., 2010).

Estos resultados confirman que el MVM se encuentra circulando en bioterios convencionales de Argentina y, según Clifford y col. (2008), este patógeno se encuentra entre las principales amenazas para la investigación científica que utiliza el ratón como modelo animal. Por otro lado se ha desarrollado una herramienta útil para el control serológico de las colonias.

Las técnicas serológicas siguen siendo métodos eficaces para detectar infecciones virales. Varios factores contribuyen al problema de controlar las infecciones por MVM, incluyendo la existencia de diferentes cepas de virus, así como factores asociados con el huésped (por ejemplo, antecedentes genéticos, edad, sexo). Las infecciones por MVM siguen siendo un problema en las instalaciones de ratones de laboratorio, por lo tanto deben ser continuamente desarrolladas técnicas sensibles y específicas (Macy y col., 2011)

Según la información obtenida a través de la búsqueda bibliográfica y de acuerdo con Schoondermark y col. (2006), Mahler y Kohl (2009), Pritchard-Corning y col. (2009), se conoce que actualmente MVM junto a MPV son los parvovirus más comunes en colonias de ratones de bioterios del mundo. Como ocurrió años atrás en muchos laboratorios de diagnóstico de agentes infecciosos de roedores utilizados para fines científicos en diferentes continentes, los resultados de estudios para la detección de MVM en colonias de ratones fueron sobreestimados ya que en esos momentos no se discriminaban el MVM del MPV, de manera que todos los diagnósticos positivos que luego correspondieron al MPV se incluyeron como el primero de los virus. No fue hasta la implementación de diagnósticos mediante la técnica de PCR que se pudo diferenciar el MVM de los nuevos parvovirus.

Por lo tanto en este estudio, cuando se utilizaron las muestras de los animales que habían sido evaluados mediante técnicas serológicas, fue necesario implementar la técnica de PCR para discriminar resultados positivos entre MVM y MPV. También fue posible detectar infecciones por MPV utilizando cebadores específicos para dicho virus (habiéndose detectado la presencia viral en varias de

las muestras de los bazos de los animales de las colonias analizadas (72 muestras positivas de 15 bioterios contaminados por MPV). Un número menor fue detectado en muestras de heces (13 bioterios contaminados con MPV), que sustentan los resultados de su alta circulación en coinfección con MVM indicado por Jacoby y col. (1996); Jacoby y Lindsey (1997); Livingston y Riley (2003); Besselsen y col. (2006); Pritchard Corning y col. (2009); Mahler y Kohl (2009) y Liang y col. (2009) en las colonias de ratones de USA, Europa, Japón y Taiwán e informado también en controles realizados por PCR por Pritchard-Corning y col. (2009); Mahler y Kohl, (2009); Liang y col. (2009) Wan y col. (2006) Schoondermark-van de Ven y Logt (2006) y Ueno y col. (1998).

En cuanto a la comparación de los resultados serológicos y moleculares, con respecto a la presencia de MVM en bioterios con varias cepas de ratones (Swiss, BALB/c y C57BL/6), la prevalencia más alta se observó en ratones BALB/c seguido por animales de la cepa Swiss en concordancia con los datos en la literatura donde los autores informan de que los ratones BALB/c son más susceptibles a la infección (Ball Goodrich y Jacoby, 1995; Jacoby y col, 1996; Redig y Besselsen, 2001). Asimismo, la menor incidencia del virus se observó en ratones C57BL/6 aunque de las muestras obtenidas no fue posible discriminar si eran 6N o 6J, aunque autores informan que C57BL/6N es resistente (más aún si son animales machos) a la infección a MVM y MPV, por lo que se requiere de una dosis infecciosa 10 a 100 veces mayor que la necesaria para las cepas BALB/c y Swiss (Besselsen y col., 2000; Skek, 2005, Janus y col., 2008).

Los ratones estudiados y positivos no manifestaron síntomas que permitieran realizar el diagnóstico clínico de infección por MVM en las colonias. Por lo tanto el carácter asintomático de la enfermedad hace evidente la importancia de contar con un método de diagnóstico de laboratorio eficiente y preciso para la detección de infecciones en los ratones.

Según lo observado en los resultados por la técnica IFI (18,13%), ELISA (18,38%) y PCR (23,71%) obtenidos son consistentes con los reportados anteriormente y son probablemente el resultado de la falta de implementación de

sistemas de barrera en la mayoría de las instalaciones convencionales de la Argentina (Laborde y col., 2011).

En colonias de ratones mantenidas bajo sistemas estrictos de barreras sanitarias, MVM es frecuentemente detectado en un número reducido de animales aunque el porcentaje de bioterios infectados puede ser alto, indicando una infección persistente, difícil de erradicar y siendo un agente de alto riesgo que debe ser vigilado con frecuencia (Clifford y Watson, 2008; Mahler y Kohl, 2009).

En este estudio se estableció que el porcentaje de muestras positivas para MVM fue variable entre los 19 bioterios contaminados (2 al 100 %) mientras que en un alto porcentaje de bioterios (41%) se detectó la presencia de una infección por MVM (teniendo en cuenta que en instalaciones abiertas si 1 animal de 10 es positivo el bioterio se considera contaminado con dicho agente), indicando la importancia de obtener una muestra representativa y utilizar técnicas de control serológicas y moleculares para una detección temprana y evitar resultados negativos falsos en colonias de ratones.

Asimismo se observó que la prevalencia tuvo variaciones en relación a las técnicas serológicas o moleculares utilizadas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo para prevalencia de MVM en las colonias de ratones de bioterios de Argentina, se observó que utilizando la técnica de PCR la prevalencia muestra valores más altos (23,71%) que utilizando técnicas serológicas como IFI (18,13) o ELISA (18,38%). Una comparación exacta de la incidencia y prevalencia de agentes infecciosos en colonias de ratones de laboratorio no siempre es posible, debido a que pueden diferir en las muestras a evaluar y según las técnicas que se utilicen para el diagnóstico. Por lo expuesto podrían observarse variaciones en el porcentaje de colonias o animales positivos para una infección en particular. Lo mismo puede ocurrir en aquellos ensayos donde se informan resultados de prevalencia de una muestra proveniente de un grupo de animales (pool de muestras) en el que al menos uno es positivo, en comparación con resultados de muestras en donde cada una está formada por un animal (Gilioli y col., 2000). En el caso de este estudio fue posible obtener resultados por grupos de animales (pool de muestras) con un porcentaje de bioterios (n=46)

contaminados con MVM (41%) como también la prevalencia de MVM por muestras (n=460, donde cada muestra es un animal) con variaciones de 18,13%, 18,38% y 23,71% según la técnica utilizada como ya fue informado.

En relación a las técnicas de diagnóstico utilizadas en este trabajo (serológicas y moleculares) se observó que cada una tiene ventajas y desventajas. En estudios más recientes donde se utilizaron técnicas serológicas, se ha informado la falta de seroconversión en algunas cepas de ratón, así como la posibilidad de infecciones persistentes y por ese motivo se ha puesto más énfasis en la utilización de la PCR como herramienta de diagnóstico. Sin embargo, aunque la PCR es sensible y específica se requiere acceso a los tejidos usualmente obtenidos durante una necropsia. Como alternativa, existe un método para la detección de MVM por PCR a partir de muestras de materia fecal el cual brinda una opción para la detección *antemortem* de parvovirus por PCR (Bauer y Riley, 2006).

Sin embargo, en este estudio las muestras de bazo, glándulas de Peter y ganglios linfáticos mesentéricos arrojaron un mayor porcentaje de muestras positivas cuando se analizaron por PCR que las muestras de heces, lo que limita este enfoque para uso general en las pruebas de rutina.

Asimismo debe tenerse en cuenta que el ensayo realizado para detección de MVM en muestras de heces por PCR posee muchas ventajas: la toma de muestras es simple, no es necesario sacrificar animales, no requiere condiciones de conservación de muestras durante varios días pero también posee desventajas como el hecho de que la detección es posible en un limitado espacio de tiempo (4-5 semanas) pos infección y que en infecciones naturales los animales a controlar deben tener entre 5 a 9 semanas de edad ya que el virus se vuelve indetectable en individuos mayores a 12 semanas (Bauer y Riley, 2006). En este estudio la recolección de muestras de pool de heces se realizó para estudiar por PCR la incidencia de MVM en las muestras provenientes de los bioterios que se controlaron, como también se realizó la toma de muestras por duplicado durante el ensayo de inoculación experimental con MVM para investigar la estabilidad del virus a -70°C y a temperatura ambiente por 7 días. En esta instancia se tuvo en

cuenta que como virus no envueltos, los parvovirus son muy resistentes a condiciones como el calor, la desecación, y los valores de pH ácidos y básicos demostrando un alto grado de estabilidad ambiental que agrava la erradicación en colonias de ratones y facilita la transmisión entre bioterios (Boschetti y col., 2003).

En los resultados que se obtuvieron no hubo variación en las muestras controladas a -70°C y a temperatura ambiente corroborando la gran estabilidad de MVM a factores ambientales. También se observó que en los animales inoculados experimentalmente con MVM se produjo una disminución del derramamiento viral (PCR en heces) a medida que la seroconversión aumentaba (sueros por IFI). En cambio la detección de MVM en muestras de bazo y otros tejidos fue posible realizarla durante un periodo de tiempo pos infección mucho mayor, siendo las muestras más indicadas aquellas provenientes de animales que iban a ser sacrificados.

En este trabajo también se evaluó la influencia que ejercieron las metodologías utilizadas en la determinación de la prevalencia en las infecciones por MVM en colonias de ratones. En este sentido se encontró que se detectó por PCR un mayor número de animales positivos y que esto influyó en un aumento del porcentaje de la prevalencia en las colonias de ratones. Besselsen y col. (2008) informan de que esta técnica parece ser la más eficiente en la detección de infecciones por MVM y otros parvovirus identificados en tejidos diana tales como bazo y ganglios linfáticos mesentéricos como también en heces de roedores. La alta sensibilidad y especificidad de esta técnica de diagnóstico permite la identificación de la infección activa y por lo tanto brotes agudos en animales que no hayan sufrido una seroconversión. Esto puede explicar los resultados diferentes aquí observados en la prevalencia de la infección por MVM donde algunos animales controlados fueron positivos por PCR pero negativos por métodos serológicos. Es importante recordar que la serología ofrece una medida indirecta de la exposición al agente, mientras que la técnica de PCR detecta directamente la presencia del agente (Livingston y Riley, 2003).

Aunque en este estudio la técnica de PCR (más sensible) permitió detectar mas animales positivos, el análisis comparativo de los métodos serológicos y

moleculares en la infección por parvovirus en ratones (Parvovirus genérico, MVM y MPV) no mostraron coincidencias de resultados en todas las muestras positivas en relación con la técnica de diagnóstico utilizada pues de los 460 animales (24,81%) con serología (Parvovirus genérico) positivos, 114 fueron detectados por PCR pero hubo 6 animales positivos por serología y negativos por PCR. Dos hipótesis pueden explicar los resultados PCR negativo de ratones seropositivos:

- a) En primer lugar, las colonias de ratones evaluadas fueron de bioterios con diferentes sistemas de barreras de protección. Probablemente los animales de estos sitios tenían un nivel bajo de infección que no fue detectado por PCR cualitativa debido a factores intrínsecos de esta metodología de diagnóstico, en los cuales la sensibilidad puede estar comprometida debido a factores tales como los inhibidores de la polimerasa, cantidad o calidad de las muestras de ADN, entre otros.
- b) En segundo lugar es posible que los animales adultos (mayor a 12 semanas) han sido expuestos al agente y que se han desarrollado una respuesta de Ac aún detectables por serología, pero no hay enfermedad, por lo que justifica los resultados negativos por PCR (Livingston y Riley, 2003).

También es importante tener en cuenta que en este estudio se evaluó el diagnóstico de la infección por parvovirus en colonias de ratones donde los animales evaluados no tenían la misma edad ya que se controlaron adultos y jóvenes y la mayoría provenían de bioterios con sistemas de barreras precarias, favoreciendo la exposición a los posibles agentes infecciosos patógenos y donde pueden ocurrir diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades que generan los mismos.

La utilización exclusiva de técnicas serológicas para la detección de infecciones por MVM luego del descubrimiento de que la producción de Ac contra MVM depende del género y fondo genético de los ratones, produjo un gran impacto en el diseño de los programas de vigilancia de la salud, ya que esto indicaría que la infección por MVM podría permanecer sin ser detectada en instalaciones de animales, especialmente cuando se usan ratones centinelas para la vigilancia (Janus y Bleich, 2012).

En cuanto a la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico de infecciones por MVM y otros parvovirus de ratones en colonias con bajas tasas de prevalencia que indican una infección persistente difícil de detectar, es esencial remarcar en que en la práctica no existe ninguna prueba de diagnóstico que sea 100% sensible o 100% específica porque existe siempre la posibilidad de obtener resultados falsos negativos o falsos positivos y se aconseja implementar técnicas serológicas y moleculares para mejorar el diagnóstico de posibles infecciones por parvovirus (Besselsen y col., 2003; Compton y Riley, 2001 y Livingston y Riley, 2003). Las técnicas serológicas como moleculares poseen fortalezas y debilidades y por tanto, ningún método debe ser utilizado exclusivamente para todas las pruebas en los programas de vigilancia de la salud de los animales de laboratorio. El uso colectivo de varios métodos es crucial para la detección precisa y las etapas de identificación de las infecciones por MVM (Redig y Besselsen, 2001). Este trabajo muestra que en base en los resultados observados de la prevalencia de MVM, la mayoría de las instituciones de experimentación con ratones y bioterios de producción animal de Argentina están aún distantes de producir y experimentar con ratones de calidad y que entre otros agentes, MVM seguirá siendo un patógeno de prevalencia difícil de erradicar. Así también los laboratorios de referencia que realizan programas de monitoreo para la salud animal en Argentina se han esforzado por consolidar directrices para implementar metodologías con mayor precisión para el diagnóstico de patógenos y agentes oportunistas de roedores mediante la adquisición de equipos y capacitación de recursos.

Teniendo en cuenta que el área que ocupa la CABA y gran Buenos Aires es el más poblado de Argentina y donde se encuentran la mayoría de las instituciones públicas y privadas de investigación y educación del país que producen y/o utilizan ratones de experimentación en sus ensayos y estudios, los resultados hallados en este trabajo revisten gran importancia. La mayoría de la información recolectada para realizar este trabajo provino de esta zona. Sin embargo es difícil estimar el número total de bioterios en Argentina que se dedican a la producción, mantenimiento y uso de colonias de ratones para experimentación, pues a pesar de la valiosa información que brinda el Sistema

Nacional de Bioterios (SNB) con sus centros adheridos y sus respectivos conjuntos de datos donde encontramos 47 bioterios dedicados a la producción y experimentación con ratones, debe sumarse un número no menos importante de bioterios pertenecientes a instituciones o laboratorios privados que no están registrados en el SNB. Durante dos décadas el LAE de la FCV/UNLP ha recibido muestras de animales de diversas instituciones privadas y públicas y, en base a la información acumulada, forman un número mayor (70 bioterios) del informado por el SNB.

La posibilidad de contar el LAE con un servicio abierto a la comunidad científica de recepción de roedores utilizados en experimentación para realizar controles sanitarios, facilitó la ejecución de este trabajo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el conjunto de las instituciones que forman parte de este estudio (n=46) refleja una medida válida de investigación de la presencia de MVM en ratones de bioterios en Argentina. El análisis de la información obtenida para evaluar los sistemas de barreras sanitarias en los bioterios, muestra que la mayoría de ellos mantiene colonias de ratones bajo condiciones convencionales. En algunos casos se observa un avance en la implementación de barreras de protección sanitaria eficientes para producir y mantener animales controlados, como por ejemplo el uso de rack ventilados o cabinas aisladoras para el alojamiento de los ratones. La desinfección periódica de las áreas de producción se aplicó en todos los bioterios evaluados (Grupos A, B y C) aunque no se trató de una única metodología de limpieza, Indudablemente el hecho de utilizar criterios más estrictos en el programa higiénico sanitario destinado al mantenimiento de la higiene en las salas de los animales y a la limpieza semanal reduce la propagación de los microorganismos y el riesgo de contaminación cruzada dentro de las colonias (Eaton, 1987). En este sentido, un 71,75% de bioterios (Grupos A y B) esterilizó los materiales e insumos por autoclave sin especificar el tipo de equipo utilizado para ese fin; siendo el autoclave de doble puerta fundamental para la producción de animales para llevar a cabo la esterilización de materiales y suministros necesarios tanto en áreas de producción como de experimentación.

Se recomienda que en los bioterios que producen y mantienen un número importante de animales, se instale más de un autoclave pues permite limitar el ingreso de microorganismos patógenos a las áreas limpias.

También es de fundamental importancia el tratamiento de los elementos que integran el microambiente de los animales.

El agua y el lecho o cama deben estar limpios, esterilizados y reemplazarse con frecuencia con el fin de evitar contaminantes perjudiciales y agentes patógenos como virus, protozoos y ectoparásitos (De Lucca y col., 1996; Andrade y col., 2002).

El 4,34% de los bioterios (Grupo A) utilizó racks ventilados como alojamiento para los ratones, aunque es un valor bajo, indica que actualmente existe un reemplazo gradual del sistema abierto (rack abierto) a un sistema cerrado (rack ventilado), ya que el uso de este equipamiento no fue informado en otros estudios anteriores en Argentina ni en el estudio de Gilioli y col. (2000) en Brasil, donde actualmente este tipo de aparatos se ha implementado extensamente en los bioterios. En ninguno de los bioterios de donde se tomaron las muestras, se encontraba instalado un sistema de ventilación y presurización automatizado ni con filtración absoluta de aire a través de filtros HEPA. Sin embargo algunas instalaciones alojaban sus animales en racks ventilados. A menor escala, en estos sistemas se produce la ventilación con filtración de aire en cada caja o habitáculo. Este equipamiento contribuye con la protección de las contaminaciones de las colonias dando como resultado una disminución de contaminantes y alérgenos suspendidos en el medio ambiente, promoviendo el bienestar y la salud de los animales y del personal (Baumans y col., 2002).

Las barreras sanitarias se definen como sistemas que combinan aspectos constructivos, equipos y métodos operativos, en el que se logra una combinación adecuada de estos tres elementos (Pessoa y col., 2008). En los resultados comparados de infección por MVM y los sistemas de barreras sanitarias implementados en los bioterios involucrados en este estudio se observa que aquellos bioterios con un número menor de barreras (Grupo C) tuvieron 100% de ocurrencia de MVM mientras que el Grupo B que posee un mayor número de

barreras, el porcentaje fue del 29% y el Grupo A (con rack ventilados) no tuvo muestras positivas para MVM. Estos resultados permitieron visualizar la relación inversa que existe entre los sistemas de barreras instalados en cada bioterio y la frecuencia del hallazgo del virus, es decir, cuanto menores o menos eficientes son las barreras, mayor es la frecuencia no solo del virus .en estudio sino también de otras contaminaciones.

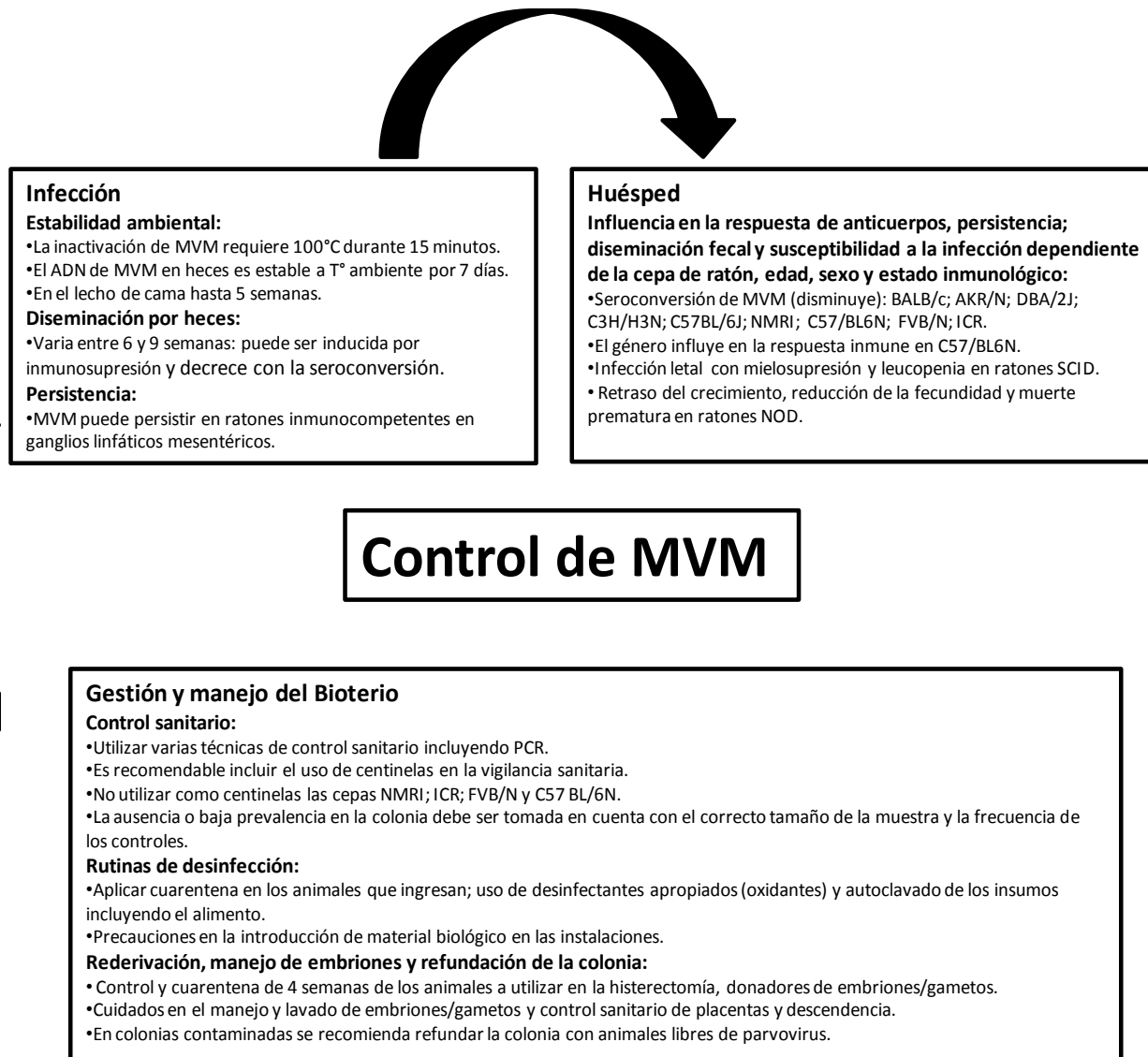
En los bioterios del Grupo C se observó una alta incidencia de MVM y está relacionada con las condiciones deficientes y falta de sistemas de infraestructura de barreras de protección, lo que favorece la contaminación de los animales por numerosos agentes patógenos y oportunistas. Aunque el grupo A se corresponde con bioterios que poseen colonias de ratones con un número de barreras sanitarias mayor en comparación con los otros grupos y no se observaron resultados positivos para MVM, los mismos fueron positivos para otros agentes patógenos (*Mycoplasma pulmonis* y *Corynebacterium kutscheri*). Este hecho este probablemente relacionado con fallas o manejo inadecuado de las barreras de contención que proporcionan el ingreso a la colonia animal. Esto demuestra que además de mejoras en el equipamiento, es necesario para la producción de ratones de experimentación de calidad instalar otras medidas de control como la eliminación de los animales infectados, desinfección correcta del ambiente, repoblación con animales SPF, instalación de duchas para el ingreso en las áreas de producción y la desinfección o esterilización de materiales y suministros (Gilioli, 2003).

En los bioterios de producción de ratones bajo sistemas de barreras sanitarias estrictos y en los cuales se han producido contaminaciones con el MVM la mejor elección es la eliminación y refundación con colonias SPF. Asimismo es importante tener en cuenta que cuando suceden este tipo de contaminaciones, antes de tomar una medida, se debe realizar un estudio pormenorizado de los eventos que puedan haber ocasionado el accidente. En caso de que se detecten deficiencias en las medidas higiénico-sanitarias, se deberán corregir antes de la ejecución de la renovación o tratamiento de la colonia. La prevención de la infección por MVM y demás parvovirus murinos debe ser realizada mediante el

control de los factores de riesgo que se asocian con posibles fuentes de infección ya sean materiales biológicos, el contacto con animales que ingresan al bioterio o posibles roedores silvestres. (Shek, 2003; Brayton y col, 2004). Además es importante señalar que los programas de cuarentena son necesarios para los materiales biológicos y los animales nuevos que se quieren ingresar en los bioterios, de manera que estos deben ser aislados hasta el momento que sea posible certificar mediante los controles sanitarios correspondientes que están libres de contaminaciones para luego introducirlos en las instalaciones de producción con seguridad (Rehg y Toth, 1998; Gilioli, 2003).

Encontrar en los resultados un número significativo de colonias infectadas con MVM indica la necesidad de una evaluación de los factores de riesgo de infección por este virus, la descontaminación de áreas, repoblar los bioterios con animales SPF y el uso de técnicas con mayor precisión en el diagnóstico para parvovirus en los programas de vigilancia de la salud animal. Un número significativo de bioterios mostraron infección por MVM en este trabajo (41%) y confirma que las condiciones de la infraestructura y el sistema barreras de protección de los bioterios de Argentina son deficientes. Aunque en los últimos años se ha hecho esfuerzos concretos, en mejorar la infraestructura (instalaciones y equipos), la educación y formación de recursos humanos con subsidios obtenidos del Estado a través de la Secretaría de Ciencia y Técnica, así como de otras agencias de financiación y también por las propias instituciones, la calidad de los animales más utilizados en experimentación (ratas y ratones) producidos en el país sigue siendo menos que el estándar requerido con las normas internacionales de la ciencia moderna de la experimentación animal. En este sentido es necesario implementar programas sostenibles de modernización en la producción y experimentación que se realizan en las instituciones al igual que tener profesionales calificados en el área de la ciencia del animal de laboratorio, tratando de adaptar y mejorar no sólo la infraestructura, sino también la formación del personal técnico para la gestión y el mantenimiento de colonias de animales utilizados en experimentación (Smith y col., 2007; Gilioli y col., 2003).

Factores a considerar en infecciones con MVM



En cuanto a la asociación de MVM y oncosupresión, el aislamiento frecuente de MVM en las células tumorales, en cultivos de virus oncogénicos, en animales portadores de tumores o en aquellos tratados con agentes físico-químicos, hizo que se considerara inicialmente como un agente etiológico de cáncer (Toolan, 1990). En referencia a los tumores, todavía no se ha demostrado que MVM causa una transformación tumoral in vitro o in vivo sino que al contrario, interfiere con el desarrollo de los tumores en animales de laboratorio infectados, mediante la actividad conocida como oncosupresión (revisado por

Toolan, 1990; Rommelaere y Cornelis, 1991). La asociación de MVM con la oncosupresión siempre se refiere a una situación in vivo y puede manifestarse como cualquiera de los siguientes efectos:

- Inhibición del implante del tumor.
- Reducción o detención del crecimiento tumoral.
- Regresión de líneas tumorales establecidas.
- Disminución del número de células tumorales durante la toma de muestras para trasplantes.
- Prolongación de la vida de los animales portadores de tumores.

En este estudio se pudo observar que en algunos animales del grupo A no hubo o fue escaso el desarrollo del tumor, probablemente debido al oncotropismo atribuido al MVM a diferencia de los resultados observados en el grupo B (con trasplante tumoral y sin inoculación de MVM) donde en todos los animales hubo desarrollo del tumor. Los resultados muestran una concordancia con los datos de la literatura donde el ciclo de MVM es estrictamente dependiente de la proliferación celular y modulada por oncoproteínas específicas que inducen condiciones hiperproliferativas y / u otras condiciones celulares estimulantes de la replicación y expresión viral. Sin embargo no está claro en la literatura y no era un objetivo de este ensayo, la notable diferencia que existe en la permisividad de la infección por MVM, en células transformadas (tumorales) frente a las células normales en proliferación lo cual puede ser debido a los controles de la transcripción y replicación celular (Bashir y col., 2000). Las células que son sensibles a los efectos citopáticos de MVM pueden expresar altos niveles de proteínas virales no estructurales (NS). Las proteínas NS1 son multifuncionales pues se requieren no sólo para la replicación y expresión del virus, sino también para la citotoxicidad celular. Sin embargo las funciones exactas en la inducción de la muerte celular todavía no han sido descifradas (Vanacker y col., 1993).

Las causas del fracaso de trasplantes tumorales en ratones y la posterior pérdida de líneas tumorales que son utilizadas por los centros de investigación puede explicarse por la existencia de múltiples vías de muerte celular en los tumores que son activadas por la infección por MVM ya que ejercen efectos

citostáticos y citotóxicos. Una serie de alteraciones moleculares se han detectado en las células que son sensibles a MVM cuando se expresan las proteínas NS1 que contribuyen al deterioro de la proliferación celular y de la supervivencia (Legendre y Rommelaere, 1992). Estos efectos incluyen la regulación de promotores celulares que inducen un daño en el ADN de una cadena en el genoma de la célula huésped y también una alteración en la síntesis celular de proteínas y la fosforilación (Anouja y col., 1997). Aunque los efectos moleculares en la eventual destrucción de las células infectadas aún no se conocen en su totalidad, existe otra incógnita y es si la especificidad del daño producido por proteínas NS1 en las células (tumores o transformadas) sensibles a MVM resulta de la modificación de la actividad de NS1 o de las células blanco del virus (Op De Beeck y Caillet-Fauquet, 1997).

En las infecciones por MVM se ha demostrado que induce apoptosis o muerte celular en varias líneas celulares comerciales y tejidos y que la activación de oncogenes está estrechamente vinculada con la regulación de este tipo de mecanismo aún en las células transformadas o tumorales que tienden a protegerse de los estímulos apoptóticos (Oshima y col., 1998; Rayet y col., 1998; Sol y col., 1999).

Tomando en cuenta los resultados de este ensayo y datos de la bibliografía en lo que se refiere a la experimentación con tumores en animales de experimentación se puede resumir que la relación existente entre MVM y la oncosupresión en tumores es:

- La mayoría de los animales portadores de MVM se vuelven resistentes a injertos tumorales.
- Hay una menor probabilidad de que las células neoplásicas, infectadas in vitro con MVM, después de formar tumores tengan éxito en la implantación en animales receptores.
- Es posible que los tumores establecidos se puedan suprimir a través de la infección de los animales portadores de tumores con MVM.

Fue un objetivo de este estudio realizar controles por PCR de varias líneas celulares tumorales que se utilizan en nuestro país para tener conocimiento de la

posible infección por MVM en las mismas. Para esto se contactó a cinco centros de nuestro país solicitando muestras tumorales o ADN de las mismas pero no hubo respuestas positivas. También se controlaron por una posible contaminación con MVM, otras líneas tumorales utilizadas en investigación por el LAE y se observaron resultados negativos por PCR en la detección de MVM y parvovirus genérico. Los controles fueron realizados en las líneas celulares de osteosarcoma humano (MG-63 CRL 1427) y la de adenocarcinoma de colon colorectal humano (HT-29 HTB-38). Los resultados obtenidos durante el desarrollo de las tareas para el objetivo propuesto en este estudio, permiten no solo continuar con el Programa de Incentivos de la UNLP que lleva adelante el personal del LAE en el que es imprescindible el uso de ratones y trasplante de tumores libres de contaminaciones, sino también abre la posibilidad de ofrecer un servicio a la comunidad científica para el control de las contaminaciones por MVM y otros parvovirus en las diversas líneas tumorales que se utilizan en experimentación en nuestro país.

Conclusiones

- ✓ La técnica serológica ELISA desarrollada resultó ser un método efectivo para la detección de Ac contra MVM.
- ✓ La PCR desarrollada es de gran utilidad para ser utilizada como técnica molecular complementaria.
- ✓ De acuerdo a los análisis realizados por el índice Kappa se observa que hay acuerdo entre los métodos de diagnósticos serológicos (IFI y ELISA) para la detección de la infección por MVM.
- ✓ La prevalencia de MVM puede variar de acuerdo con el método de diagnóstico empleado y la muestra elegida para su detección, siendo en este estudio el porcentaje más alto el obtenido mediante la utilización de la técnica de PCR desarrollada en muestras de bazo de ratones.
- ✓ Se ha observado una alta prevalencia de MVM en las colonias de ratones de las instituciones de Argentina evaluadas en este estudio.
- ✓ No se detectaron animales positivos en los bioterios del Grupo A, es decir, en aquellos que poseen más barreras sanitarias en comparación con los Grupos B y C con menos barreras sanitarias donde se encontraron animales positivos para MVM.
- ✓ La mayoría de los bioterios evaluados no tienen infraestructura, equipamiento y barreras de protección sanitaria adecuadas para prevenir la transmisión e infecciones por MVM.
- ✓ En la mayoría de los animales contaminados con MVM no se produce el desarrollo de tumores transplantados.

- ✓ Cuando se utilizan ratones inmunodeficientes como modelo animal para realizar estudios que involucran el trasplante y crecimiento de tumores humanos es importante establecer la ausencia del MVM tanto en estos individuos como en las líneas tumorales.
- ✓ Se espera que los resultados obtenidos a través de este estudio puedan realizar un aporte al mejoramiento de la situación actual de los bioterios de producción y experimentación de Argentina.

Bibliografía

1. Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA). (Manual de ELISA, 1989).
2. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, organizadores. Animais de laboratorio: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002; 388p.
3. Anouja F, Wattiez R, Mousset, S and Caillet-Fauquet P. The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. Journal of Virology, 1997; 71: 4671–8.
4. Antonietti H, Sahli P. Characterization of determinant in the genome of Minute Virus of Mice. J. Virology, 1998; 62:552-557.
5. Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Doyma, Barcelona, 1992.
6. Astell CR. Parvoviruses (Parvoviridae), General Features and Molecular Biology. En: Granoff A, Webster RG. Encyclopedia of Virology (second edition), Academic Press, California (USA), 1999; p. 1151-1159.
7. Ayala M., Laborde JM., Milocco S., Carbone C., Cid de la Paz V., Galosi C. Virus Kilham por la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación. Revista Argentina de Microbiología ISSN: 0325-7541, Año 2004. 36: 16-19.
8. Baer PN, Kilham L. Dental defects in hamsters infected with Minute virus of mice. Surg Oral. Med Oral. Pathology, 1974; 37: 385-9.

9. Baker, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. *Clin. Microb. Rev.*, 1998; v.11, n.2, p.231-266.
10. Ball-Goodrich LJ, Johnson E. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J Virology*, 1994; 68(10):6476-86.
11. Ball-Goodrich LJ, Hansen G, Dhawan R, Paturzo FX, Vivas-Gonzalez BE. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. *Comp Med.*, 2002; 52(2):160-6.
12. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim.* 1994; 28(3):193-211. Review.
13. Balls M. The origins and early days of the Three Rs concept. *Altern Lab Anim.* 2009; 37(3):255-65.
14. Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals*, 2004; 32(4):177-82.
15. Bauer BA, Riley LK. Antemortem detection of Mouse parvovirus and Mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples. *Lab Anim.* 2006; 40(2):144-52.
16. Baumans V, Schlingmann F, Vonck M, van Lith HA. 2002. Individually ventilated cages: beneficial for mice and men?. *Contemp Top Lab Anim Sci* 41:13–1.

17. Bashir T, Horlein R, Rommelaere J and Willwand K. Cyclin A activates the DNA polymerase delta-dependent elongation machinery *in vitro*: A parvovirus DNA replication model. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2000; 97: 5522–5527.
18. Berns KI. The Parvoviruses. Plenum Press, New York, 1984.1-31.
19. Besselsen DG, Besch-Williford CL, Pintel DJ, Franklin CL, Hook RR Jr, Riley LK. Detection of newly recognized rodent parvoviruses by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33(11):2859-63a.
20. Besselsen DG, Pintel DJ, Purdy GA, Besch-Williford CL, Franklin CL, Hook RR Jr, et al. Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. J Gen Virol. 1996; 77 (5):899-911.
21. Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by PCR. Methods Mol Biol. 1998; 92:31-7.
22. Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. Effect of mouse strain and age on detection of *Mouse parvovirus 1* by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. Comp Med. 2000; 50(5):498-502.
23. Besselsen DG, Romero MJ, Wagner AM, Henderson KS, Livingston RS. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. JGen Virol. 2006; 87(Pt 6):1543-56.
24. Besselsen DG, Franklin CL, Livingston RS, Riley LK. Lurking in the shadows: emerging rodent infectious diseases. ILAR J. 2008; 49(3):277-90.

25. Blank WA, Henderson KS, White LA. Virus PCR assay panels: an alternative to the mouse antibody production test. *Lab Anim (NY)* 2004; 33(2):26-32. Comment in: *Lab Anim (NY)*. 2004; 33(2):7.
26. Bonnard GD, Manders EK, Campbell DA Jr, Herberman RB, Collins MJ Jr. Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for *Minute virus of mice* causing the inhibition. *J Exp Med.* 1976; 143(1):187-205.171.
27. Bootz F, Sieber I, Popovic D, Tischhauser M, Homberger FR. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Lab Anim.* 2003; 37(4):341-51.
28. Boschetti N, Wyss K, Mischler A, Hostettler T, Kempf C. Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* 2003; 31:181–5.
29. Brayton C, Mähler M, Nicklas W. Viral infections. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. *The Laboratory Mouse*. Hannover: Elsevier Academic Press, 2004; p. 357-391.
30. Brown E, Stanford L, Schellinck HM. Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice. *ILAR J.* 2000; 41:163-74.
31. Brownstein, D. G., A. L. Smith, E. A. Johnson, D. G. Pintel, L. K. Naeger , and P . Tattersall. The pathogenesis of infection with Minute Virus of Mice depends on the expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J. Virol.* 1992; 66:31 18-3124.

32. Brownstein DG, Smith AL, Jacoby RO, Johnson EA, Hansen G, Tattersall P. Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of *Minute virus of mice* and regulation by host genotype. *Lab Invest.* 1991; 65(3):357-64.
33. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. *Nature Reviews Genetics*, 2003; 4, 195-205.
34. Bueren JA, Segovia J, and Almendral J. Cytotoxic infection of hematopoietic stem and committed progenitor cells by the parvovirus Minute Virus of Mice. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1991; 628:262-272.
35. Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual.* San Diego: Academic Press, 1992; 250p.
36. Cagliada p, Maschi F, Laborde J, Milocco S, Carriquiriborde M, Ayala M, Carbone C. Sentinel program for health monitoring of animals housed in IVC. Congreso SAIC-SAI-SAFE 2016
37. Cardoso C. Legislação Brasileira para o Uso de Animais em Pesquisa. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM, organizadores. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório.* São Paulo: Atheneu, 2009; p. 11-28.
38. Carter JB and Saunders VA. Parvoviruses (and other ssDNA viruses). *Virology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex (England), 2007; p. 137-146.
39. Carthew P, Sparrow S, Verstraete AP. Incidence of natural virus infections of laboratory animals 1976-1977. *Lab Anim.* 1978; 12(4):245-6.

40. Carthew P, Verstraete A. A serological survey of accredited breeding colonies in the United Kingdom for common rodent viruses. *Lab Anim.* 1978; 12(1):29-32.
41. Carty AJ. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. *ILAR J.* 2008; 49(3):272-6.
42. Casebolt DB, Lindsey JR, Cassell GH. Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. *Lab Anim Sci.* 1988; 38(3):327-9.172
43. Casebold D, Qian B, Stephensen C. Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. *Lab. Anim. Sci.* 1997; v.47, n.1, p.6-10.
44. Chang A, Havas S, Borellini F, Ostrove JM, Bird RE. A rapid and simple procedure to detect the presence of MVM in conditioned cell fluids or culture media. *Biologicals*, 1997; 25(4):415-9.
45. Charles River Laboratories. Serologic testing of rodents for viral infections: Interpretation of results. Charles River Laboratory, 1991; p.1-8 (Technical Bulletin).
46. Clifford CB, Cosentino JM. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2006; 45:86.
47. Clifford CB, Watson J. Old enemies, still with us after all these years. *ILAR J.* 2008; 49(3):291-302.

48. Clough G, Gamble MR. Laboratory Animal House: A guide to design and planning of animal facilities. Carshalton, Surrey, Medical Research Center. Laboratory Animal Centre, 1988; p.44 (LACC manual series; m.4).
49. Coates, ME. Muhlbock memorial lectura: man, microbes and models. Lab. Anim. Sci. 1992; 42: 436-438.
50. Collins MJ and Parker JC. Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors. J. Natl. Cancer Inst. 1992; 49:1 139-143.
51. Compton SR, Riley LK. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. Comp Med. 2001; Apr. 51(2):113-9. Comment in: Comp Med. 2001; Apr. 51(2):109.
52. Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, MacArthur-Clark J. 2004a. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. Comp Med 54:382-92.
53. Cornelis J, Becquart N, Duponchel N, Salome B L, Valosse, M and Rommelaere J. Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and Minute Virus of Mice. J. Virol.1988; 62:1679-1986.
54. Cornelis J, Spruyt N, Spegelaere P, Guetta E, Darawishi T, Cotmore S, and Rommelaere J. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus Minute Virus of Mice correlates with an increase in viral gene expression. J. Virol. 1988; 62:3438-3444.

55. Cotmore SF, Tattersall P. Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology*, 1990; 177(2):477-87.
56. Cotmore S, and Tattersall P. 1986. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 58:724-732
57. Coutelier JP, Coulie PG, Wauters P, Heremans H, Van der Logt JT. In vivo polyclonal lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J Virol.* 1990; 64(11):5383-8.
58. Couto S. Instalações e barreiras sanitárias. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. (Orgs). *Animais de laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 33 - 43.
59. Crawford LV. A Minute virus of mice. *Virology*. 1966; 29(4):605-612.
60. Crawford LV, E.A. Follett, M.G. Burdon, D.J. Mc Geoch. The DNA of a minute virus of mice. *J. Gen. Virol.*, 4 (1969), pp. 37-46
61. Cross SS. and Parker, J.C. Some antigenic relationships of de murine parvovirus: Minute virus of mice, Rat virus and H-1 virus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1971; 139:105-108.
62. De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T, organizadores. *Manual para técnicos en bioterismo*. 2. ed. São Paulo: Winner Graph, 1996; 259p.
63. Descoteaux JP, Grignon-Archambault D, Lussier G. Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies. *Lab Anim Sci.* 1977; 27(5 Pt 1):621-6.173

64. Detmer A. Zoonoses. In: Svendsen P, Hau J, eds. Handbook of laboratory animal science. New York: CRC Press, 1994; p. 71-8.
65. Dhawan RK, Wunderlich ML, Cowley JP, Ibriami T, Dodge M, Berg E, et al. Virus -like particles as antigen for serological detection of rat parvovirus antibodies. *Contemp. Top Lab Anim.* 2004; 43:43-44.
66. Eaton, P. Hygiene in the animal house. In: Poole TB, Robinson R, eds. *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th edition. New York: Churchill Livingstone Inc. 1987; p. 145-158.
67. Engers H D, Louis J, Zubler Jand Hirt B. Inhibition of t cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to the Minute Virus of Mice. *J. Immunol.* 1981; 127:2280-2285.
68. Fassolitis AC, Peeler J, Jones V and Larkin E. Thermal resistance of three parvoviruses: a possible human isolate, the Minute Virus of Mice, and the latent rat virus. *J. Food. Protect.* 1985; 48:4-6.
69. Fentener Van Vlissingen JM, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F, Torres YS. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. *Lab. Anim.* 2015 Oct; 49(4):267-83.
70. Fernandez W, Batista-Castro Z, De Lucca M, Ruano M, García-Barceló A, Rivera-Cervantes M, García-Rodríguez J, Sánchez-Mateos S. El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Rev. Med. Exp. Salud Pública*, 2016; vol. 33 no. 2 Lima.
71. Fikrig MK, Tattersall P. Latent parvoviral infection of continuous cell lines. *Dev. Biol. Stand.* 1992; 76: 285-93.

72. Filipovska-Naumovska E, Abubakar SM, Thompson MJ, Hopwood D, Pass DA, Wilcox GE. Serologic prevalence of MPV 1 in mouse strains in a commercial laboratory mouse colony determined by using VP1 antigen. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49(4):437-42.
73. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 2002; 19(2):73-8. PubMed PMID: 12098013.
74. Fosse RT. Computers and alternative to animals in biomedical research. In: Svendsen P, Hau J. *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*. Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1994; v.I, p. 145.
75. Foster H L, Small JD, Fox JG. *The Mouse in Biomedical Research.* v. 2 - Diseases. New York: Academic Press, 1982; p. 110-406.
76. Fox JG, Newcomer CE, Rozmiarek H. Selected zoonoses and other health hazards. In: Fox J, Cohen B, Loew L, ed. *Laboratory Animal Medicine*. New York: Academic Press. 1984; P. 613-48.
77. Fox E, Moen P and Bodnar J. Replication of Minute Virus of Mice DNA in Adenovirus-infected or Adenovirus transformed cells. *Virology,* 1990; 176:403-412.
78. Frieden T, M.D., MPH, director, U.S. Centers for Disease Control and Prevention news releases, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, and the U.S. Military HIV Research Program, Silver Spring, Md.; *Associated Press*; June 17, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* June 28, 2016.

79. Gannon J, Carthew P. Prevalence of indigenous viruses in laboratory animal colonies in the United Kingdom, 1978-1979. *Lab Anim.* 1980; 14(4):309-11.
80. Gardiner E and Tattersall P. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Virol.* 1988; 62:2605-2613.
81. Garnick R. Experience with viral contamination in cell culture. *Dev. Biol. Standard.* 1996; 88:49-56.
82. Giese NA, Raykov Z, De Martino L, et al. Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 432–42.
83. Gilioli R, Sakurada JK, Andrade LA, Kraft V, Meyer B, Rangel HA. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab Anim Sci.* 1996; 46(5):582-4.
84. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. Campinas; 2003. Doutorado [Tese em Genética e Biologia Molecular]. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
85. Gondo Y. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(10):803-10.
86. Goto K, Hayashimoto N, Ishida T, Takakura A, Kagiya N. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of

microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. *Exp Anim.* 2009; 58(1):47-52.

87. Goto, K. ; Takakura, A. ; Yoshimura, M. ; hnishi, Y. ; Itoh, T. Detection and typing of lactate dehydrogenase-elevating virus RNA from transplantable tumors, mouse liver tissues, and cells lines, using polymerase chain reaction. *Lab. Anim. Sci.* 1998; 93 v.48, n.1, p.99-102.
88. Graham ML, Prescott MJ. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *Eur J Pharmacol.* 2015; 759:19-29. doi: 10.1016/j. ejphar. 2015.03.040.
89. Guetta E, Graziani Y. Suppression of Ehrlich Ascites tumors in mice by Minute V irus of Mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986; 76:1 177-1 180.
90. Guetta E, Mincberg M, Mousset S, Bertinchamps C,Rommelaers J. Selective killing of transformed rat cells by Minute Virus of Mice does not require infectious virus production. *J. Virol.* 1990; 64:458-462.
91. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Institute of laboratory animals National Research Council. México: Academia Nacional de Medicina, 2002; p. 148.
92. Guide for the care and use of laboratory animals eighth edition. 2011
93. Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2012; 51(3):311-21.
94. Harris RE, Coleman PH, Morahan PS. Stability of *Minute virus of mice* to chemical and physical agents. *Appl Microbiol.* 1974; 28(3):351-4.

95. Harris R, Coleman P, and Morahan P. Erythrocyte association and interferon production by Minute Virus of Mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1974; 145:1288-1292.
96. Hartley, J. W., and W. P. Rowe. 1960. A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology* 11:645-647.
97. Hendriksen CF. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review Vaccines*. 2009; 8(3):313-22. Doi: 10.1586/14760584.8.3.313.
98. Holst JJ. Isolated organs as replacements for vertebrate animals. In: Svendsen, P.; Hau, J. *Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*: Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1994; vi, p. 397-408
99. Institute for Laboratory Animal Resources - ILAR. Long term holding of laboratory rodents. A report of the Committee on Long-term Holding of laboratory rodents. *ILAR News*, 1976; 19 (4) L1-L25.
100. Itoh T. Quality testing system for SPF animals in Japan and problems in the management of such systems. In: International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. *Microbial and phenotypic definition of rats and mice. Proceedings of the 1998 US/Japan conference*. Washington DC: National Academic Press, 1999; P. 15-23. 175.
101. Jacob, RO and Ball-Goodrich LJ. Parvovirus infections of mice and rats. *Sem. Virol.* 1995; 6:329-337.

102. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech.* 1998;17: 469-526.
103. Jacoby RO, Johnson EA, Paturzo FX, Gaertner DJ, Brandsma JL, Smith AL. Persistent *Rat parvovirus* infection in individually housed rats. *Arch Virol.* 1991; 117(3-4):193-205.
104. Jacoby RO, Johnson EA, Ball-Goodrich L, Smith AL, McKisic MD. Characterization of *Mouse parvovirus* infection by in situ hybridization. *J Virol.* 1995; 69(6):3915-9.
105. Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci.* 1996; 46(4):370-80.
106. Jacoby RO, Lindsey JR. Health care for research animals is essential and affordable. *FASEB J.* 1997; 11(8):609-14.
107. Jacoby RO, Smith AL. *Mouse parvovirus*: survival of the fittest. *Comp Med* 2003; 53(5):470-1; BHATT PN, JONAS A M. Viral Diseases. In: BAKER HJ, LINDSEY J R, WEISBROTH SH. *The Laboratory rat. v.1 - Biology and Diseases.* New York: Academic Press, 1979; p. 271-302.
108. Jacoby RO, Gaertner D. Viral disease. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL editors. *The laboratory rat.* San Diego: Academic Press, 2006; p. 423-51.
109. Janus L, Bleich A. Coping with parvovirus infections in mice: health surveillance and control. *Lab Anim.* 2012. Jan; 46(1):14-23.

110. Janus LM, Mähler M, Köhl W, Smoczek A, Hedrich HJ, Bleich A. Minute virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice. *Comp Med*. 2008; 58(4):360-8.
111. Janus LM, Smoczek A, Jorns A, Hedrich HJ, Bleich A. Presence of minute virus of mice in immunocompetent mice despite the onset of host immunity. *Vet. Microbiol* 2010; 146: 51–8.
112. Jordan E K, and Sever J. Fetal damage caused by parvoviral infections. *Reprod. Toxicol*. 1994; 8:161-189.
113. Kapil, S. Minute Virus of Mice (MVM) nucleic acid production in susceptible and resistant strains of mice and F1 hybrids. 1995.
114. Kilham L, Margolis G. Spontaneous hepatitis and cerebellar "hypoplasia" in suckling rats due to congenital infections with *Rat virus*. *Am J Pathol*. 1966; 49(3):457-75.
115. Kilham L. Mongolism associated with *Rat virus* (RV) infection in hamsters. *Virology*, 1971; 13: 141-3. 176.
116. Kilham L and Margolis G. Problems of human concern arising from animal models of intrauterine and neonatal infections due to viruses: a review I. Introduction and virologic studies. *Progr. Med. Virol*. 1995; 20:1 13-143.
117. Kimsey PB, Engers H, Hirt B and Jongeneel V. Pathogenicity of fibroblast and lymphocyte-specific variants of Minute Virus of Mice. *J. Virol*. 1986; 59:8-13.

118. Koering CE, Geuskens M and Rommelaere J. Continuous production of Minute Virus of Mice by an untransformed variant of Fisher rat fibroblast (FR3T3). *J.Gen. Virol.* 1996; 77:447-452.
119. Krattf V, Deeny AA, Blanchet HM, Boot R, Hansen AK, Hem, A. ; von Herck, H. ; Kunstyr, I. ; Milite, G. ; Needhan, J.R. ; Niclas, W. ; Perrot, A. ; Rehbindler, C. ; Richard Y. ; De Vroey, G. FELASA Working Group on Animal Health : Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Lab. Anim.* 1994; v.28, p.1-12.
120. Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice and lethal intestinal virus infection of infant mice. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1966; 20:55-61.
121. Kraft V, Meyer B. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. *Lab Anim Sci.* 1986; 36(3):271-6.
122. Kunita S, Chaya M, Hagiwara K, Ishida T, Takakura A, Sugimoto T, et al. Development of ELISA using recombinant antigens for specific detection of mouse parvovirus infection. *Exp Anim.* 2006; 55(2):117-24.
123. Laborde JM, Carriquiriborde M, Cagliada P, Milocco S, Ayala M, Cid de la Paz V, Galosi C, Carbone C. Estudio de la prevalencia de anticuerpos contra el virus diminuto del ratón en colonias de ratones de la República Argentina. *Revista Medicina. Buenos Aires*, 2011; V 71 Supl III pag: 77.
124. Laborde JM, Carbone C, S Corva, Galosi C. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for routine screening of Theiler's murine encephalomyelitis virus antibodies in mice colonies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* Vol. 20, Number 6. 2008.

125. Lamana, M L, Albella, B, Bueren, J & Segovia, JC (2001). In vitro and in vivo susceptibility of mouse megakaryocytic progenitors to strain i of parvovirus minute virus of mice. *Exp Hematol* 29, 1303–1309.
126. Lane-Petter W. The animal house and its equipment. In: UFAW, Hume CW. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals*. 5th ed. Edinburg: Churchill Livingstone. 1976; P.75-134.
127. Legrand, C, Mousset J, Salome N and Rommelaere J. Cooperation of oncogenes in cell transformation and sensitization to killing by the parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:2003-2009.
128. Legendre D. and Rommelaere J. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans-inhibition. *Journal of Virology*, 1992; 66: 5705–13.
129. Liang CT, Shih A, Chang YH, Liu CW, Lee YT, Hsieh WC, et al. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009; 48(4):381-6.
130. Lindsey JR, Boorman GA, Collins MJ, Hsu CK, Van Hoosier GL, Wagner JE. Infectious diseases of mice and rats. Committee on infectious diseases of mice and rats. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington D.C. National Academic Press. 1991; 397 p.
131. Lindsey JR, Casebolt DB, Cassel GH. Animal health in toxicological research: an appraisal of past performance and future prospects. In: Davies CL, Baldwin JK, Hoover BK, eds. *Managing conduct and data quality of toxicology studies*. New Jersey: Princeton Scientific Publishing, 1986; P. 155-71.

132. Livingston RS, Besselsen DG, Steffen EK, Besch-Williford CL, Franklin CL, Riley LK. Serodiagnosis of *Mice minute virus* and *Mouse parvovirus* infections in mice by enzymelinked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):1025-31.177
133. Livingston RS, Riley LK. Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents. Lab Anim. 2003; 32(5): 44-51.
134. Lussier G, Descôteaux JP. Prevalence of natural virus infections in laboratory mice and rats used in Canada. Lab Anim Sci. 1986; 36(2):145-8.
135. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Parvoviridae (Cap. 12). Fenner's Veterinary Virology 4th ed. Academic Press. Elsevier. Inc. 2011; pp 225-235.
136. Macy JD, Cameron GA, Smith PC, Ferguson TA, Compton SR. Detection and control of mouse parvovirus. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2011; 50(4):516–22.
137. Mähler M, Nicklas W. Health monitoring. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P; eds. The Laboratory Mouse. Hannover: Elsevier Academic Press, 2004; p. 449-462.
138. Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in Western Europe. Lab Anim (NY). 2009; 38(5):161-5.
139. Mahler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning B and Raspa B. FELASA recommendations for the health

monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 2014, Vol. 48 (3) 178–192.

140. Mann MD, Crouse DA, Prentice RD. Especial topic Overview: appropriate animal numbers in biomedical research in light of animal welfare considerations. *Lab Anim Sci.* 1991; 41:6-14.
141. McKisic MD, Lancki DW, Otto G, Padrid P, Snook S, Cronin DC, et al. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J Immunol.* 1993; 150(2):419-28.
142. McLaren LC. Hemagglutination inhibition and hemadsorption. In: Specter S, Lancz GJ editors. *Clinical Virology Manual*. New York: Elsevier Science Publishing Company, 1986; p. 202-203.
143. McMaster GK, Beard P, Engers HD, Hirt B. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J. Virol.*, 38 (1981), pp. 317–326.
144. Medical Research Council. *Laboratory Animals Centre (UK). The accreditation and recognition schemes for suppliers of laboratory animals*. Carshalton, Surrey, 1974; p.30-2. [Manual series No.1, 2ed.].
145. Menendez RC. *Animals de laboratorio en las investigaciones biomédicas*. Cuba: La Habana Editorial Ciencias Medicas, 1985.
146. Mohanty SB, Bachmann PA (1994) Susceptibility of fertilized mouse eggs to minute virus of mice. *Infection and Immunity* 9, 762–3

147. Nakagawa M, Saito M, Suzuki E, Nakayama K, Matsubara J, Muto T. Ten years-long survey on pathogen status of mouse and rat breeding colonies. *Exp Anim*. 1984; 33(1):115-20.
148. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. *Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório*. Goiânia: AAALAC/COBEA, 2003; 162p.
149. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Committee on Long-term Holding of Laboratory Rodents. Long-term holding of laboratory rodents: a report. *ILAR News*, 1976; v.19, n.4, p.22-23.
150. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washinton, D.C.: National Academy Press, 2011.
151. Naugler, S, Myles, M, Bauer B, Kennett M & Besch Williford C. Reduced fecundity and death associated with parvovirus infection in B-lymphocyte deficient mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2001; 40, 66.
152. Nettleton P, Rweyemamu M. The association of calf serum with the contamination of BHK-21 clone 13 suspension cell by a parvovirus serologically related to the minute virus of mice (MVM). *Arch Virol*. 1980; 64(4):359-74.
153. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, et al.; FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*. 2002; 36(1):20-42.

154. Nicklas W, Kraft V, Meyer B. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci.* 1993; 43(4):296-300.
155. Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, et al. Induction of apoptosis *in vitro* and *in vivo* by H-1 parvovirus infection. *Journal of General Virology*, 1998; 79: 3067–71.
156. Op De Beeck, A. and Caillet-Fauquet, P. The NS1 Protein of the autonomous parvovirus minute of mice in block cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *Journal of Virology*, 1997; 71:5323-9.
157. Organización Mundial para la Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). 2004.
158. Parker JC, Collins MJ Jr, Cross SS, Rowe WP. Minute virus of mice. Prevalence, epidemiology, and occurrence as a contaminant of transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1970; 45(2):305-10.
159. Parker JC, Von Kaenel EA, Collins Jr. MJ, Howton PH Diagnostic Procedures for Viral Infection of Laboratory Rodents. Murine Virus Diagnostic Laboratory. Bethesda: Microbiological Associates Inc., Maryland, 1978; p. 2-40.
160. Paton W. Man and Mouse. Animals in Medical Research. New York: Oxford University Press, 1984; 162p.
161. Pelkonen KHO. Cell cultures as replacements for vertebrate animals. Handbook of Laboratory Animal Science: Selection and Handling of Animals

- in Biomedical Research: Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1994; v.I, p. 409-418.
162. Pessoa MC, Lapa RC, Vieira VM. Arquiteura e Biosegurança. In: Molinaro EM, Majerowicz J, Valle S, organizadores. Biossegurança em Biotérios. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008; 19-33.
 163. Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim*. 2009; 43(2):165-73. Epub 2008. Nov 17.
 164. Pritchett KR, Henderson KS, Simmons JH, Shek WR. Differences in susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to infection with a field isolate of *Mouse parvovirus* (MPV-1). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006; 45:72.
 165. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J and Dinsart C. Induction of programmed cell death by parvovirus in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signaling pathway. *Journal of Virology*. 1998; 72: 8893–903.
 166. Redig AJ, Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comp Med* 2001; 51(4):326-31. Erratum in: *Comp Med*. 2003; 52(2): following table of contents.
 167. Reh binder C, Baneaux P, Forbes D, Van Herk H, Niclas W, Rugaya Z, Winkler G. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea-pig and rabbit experimental units. *Lab. Anim*. 1996; v.30, p.193-208.

168. Rehag JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles and practice. *Lab Anim Sci.* 1998; 48: 438-77.
169. Riley LK, Knowles R, Purdy G, Salomé N, Pintel D, Hook RR Jr, et al. Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2):440-4.
170. Rioloobos, L., Valle, N., Hernando, E., Maroto, B., Kann, M., and J. M. Almendral. Viral oncolysis that targets Raf-1 signalling control of nuclear transport. *J. Virol.* 2010; 84, 2090-2099.
171. Rommelaere J, Cornelis JJ. Antineoplastic activity of parvoviruses. *Journal of Virology Methods*, 1999; 33: 233–51.
172. Rowan, A.N. The benefits and ethics of animal research. *Scientific Am.*, February, 1997; p. 63-77.
173. Russel WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1959, 238p. Apud Balls M, Festing MFW, Flecknell PA. The three Rs: development in laboratory animal science. *Lab Anim.* 1994; 28:193-321.
174. Sanchez J, Dohoo IR, Markham F, Leslie K, Conboy G. Evaluation of the repeatability of a crude adult indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA and methods of expressing test results. *Vet Parasitol.* 2002; 109(1-2):75–90.
175. Schlehofer JR, Rentrop M, Mannel DN. Parvoviruses are inefficient in inducing interferon-beta, tumor necrosis factor-alpha, or interleukin-6 in mammalian cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 1992; 181:153–164.

176. Schoondermark-van de Ven EM, Philipse-Bergmann IM, Van Der Logt JT. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. Lab Anim. 2006; 40(2):137-43.
177. Segovia, J. C., J. M. Gallego, J. A. Bueren, and J. M. Almendral. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected by the parvovirus minute virus of mice. 1999. J. Virol. 73:1774-1784.
178. Segovia, J. C., A. Real, J. A. Bueren, and J. M. Almendral. 1991. In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells. Blood 77:980-988.
179. Segovia, J. C., G. Guenechea, J. M. Gallego, J. M. Almendral, and J. A. Bueren. 2003. Parvovirus infection suppresses long-term repopulating hematopoietic stem cells. J. Virol. 77:8495-8503.
180. Shek W. Estandardization of rodent health surveillance: regulation versus competition. In: International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats. Proceedings of the 1999 US/Japan Conference. Washington DC: National Academic Press, 2000; P.11-15.
181. Shek WR, Paturzo FX, Johnson EA, Hansen GM, Smith AL. Characterization of Mouse parvovirus infection among BALB/c mice from an enzootically infected colony. Lab Anim Sci. 1998; 48(3):294-7.
182. Shek, W. Charles River Laboratories Short Course. Detecting & Controlling Rodent Parvoviruses. [s.l.]: [s.n.]. 2003; 14 p.

183. Shek WR, Pritchett KR, Clifford CB, White WJ. Large-scale rodent production methods make vendor barrier rooms unlikely to have persistent low-prevalence parvoviral infections. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2005; 44(4):37-42.
184. Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ and Tattersall. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*, 1984; 23: 61-73.
185. Smith AL, Jacoby RO, Johnson EA, Paturzo F, Bhatt PN. In vivo studies with an "orphan" parvovirus of mice. *Lab Anim Sci*. 1993; 43(2):175-82.
186. Smith A. Response of weanling random-bred mice to inoculation with Minute virus of mice. *Lab Anim Sci*. 1983; 33(1):37-9.
187. Smith A. Serologic tests for detection of antibody to rodent viruses. In: Bhatt, P.N; JACOB, R.O; MORSE, H.C. eds. *Viral and mycoplasmal infection of laboratory rodents: effects on biomedical research*. New York: Academic Press, 1986; p. 731-52.
188. Smith A, Van Den Broek FA, Martorell JC, Hackbarth H, Ruksenas O, Zeller W, et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab Anim*. 2007; 41(2):143-60.
189. Sol N, Le Junter J, Vassias I. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *Journal of Virology* 1999; 73: 8762–70.

190. Souza M., Smith A.L. Comparison of isolation in cell culture with convencional and modified mouse antibody prodution test for detection of murine viruses. J. Clin. Microb.1989; v.27, p.185-7.
191. Spalholz BA, Tattersall P. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors.- Journal of virology, 1983 - Am Soc Microbiol.
192. Svendsen P, Hau J. Handbook of Laboratory Animal Science: Animals models. Ann Arbor: CSC Press, Inc. 1994; VII. 212p.
193. Svendsen P. Environmental impact on animal experiments. In: Svendsen P, Hau J, eds. Handbook of laboratory animal science: selection and handling of animals in biomedical research. Florida: CRC Press; 1994. P.191 202.
194. Tamaoki N. The need for defined rats and mice in biomedical research: problems, issues, and the current state of affairs. In: Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice. Proceeding of the 1998 US/Japan conference. National Research Council. New York: National Academic Press, 1999; p. 7 11.
195. Tattersall P, Cawte PJ, Shatkin AJ, Ward DC. Three structural polypeptides coded for by *Minute virus of mice*, a parvovirus. J Virol. 1976; 20(1):273-89.
196. Tattersall P, Cotmore SF. The rodent parvoviruses. In: Bhatt PN, Jacoby RO, Morse HC, New AE, editores. Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodent: effects on biomedical research. Orlando: Academic Press, 1986; P.305-348.

197. Tattersall P, Bratton J. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice.- Am Soc Microbiol. Journal of virology, 1983. Jun; 46(3): 944–955.
198. Taylor K, Copley CG. Diagnosis of *Kilham rat virus* using PCR. Lab Anim. 1994; 28(1):26-30.
199. Toolan HW. Experimental production of mongoloid hamsters. Science, 1960; 131:1446-8.
200. Toolan HW. Degeneration of lens and overgrowth of Harderian glands in hamsters neonatally injected with parvovirus MVM-i. Proc Soc Exp Biol Med. 1983; 172:351-356.
201. Toolan, H. The rodent parvoviruses. In: P. Tijssen (ed.), *Handbook of Parvoviruses, Volume II*. Boca Raton: CRC Press, 1990; pp. 159–76.
202. Trexler PC. Animal of defined microbiologicals status. In: Poole TB, editor. The Ufaw handbook on the care and management of laboratory animals. 6th eds. New York: Churchill Livingstone, 1987; P. 85-98.
203. Ueno Y, Iwama M, Ohshima T, Sugiyama F, Takakura A, Itoh T, Yagami K. Prevalence of "Orphan" parvovirus infections in mice and rats. Exp Anim. 1998; 47(3):207-10.
204. Vanacker JM, Laudet V, Adelmant G. et al. Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *Journal of Virology*, 1993; 67: 7668–72.

205. Vessel ES, Lang CM, White WJ. Environmental and genetics factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Fed Proc.* 1976; 35: 1125-32.
206. Von Hoosier G, The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine. *Scand J Lab Anim Sci.* 1999; 26 (4): 176-184.
207. Waggle K, Kagiya N, Allen AM, Nomura T. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals.* 2 ed. Bethesda: National Institute of Health Publication, 1994; p. 1-109. (Publication n.94.2498).
208. Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, Riley LK. Detection of Rat parvovirus type 1 and Rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. *Lab Anim.* 2006; 40(1):63-9.
209. Ward DC, Tattersall PJ. *Minute virus of mice.* In: Foster HL, Small JD, Fox JG, editores. *The mouse in biomedical research: diseases.* New York: Academic, 1982; v. 2. P.313-333.
210. Ward D.C, and Tattersall P. *Replication of Mammalian Parvoviruses.* Cold Spring Harbor Press, New York, 1978.
211. Weisbroth SH, Peters R, Riley LK, Shek W. Microbiological assessment of laboratory rats and mice. *ILAR J.* 1998; 39(4):272-290.
212. Zenner L, Regnault JP. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. *Lab Anim.* 2000; 34(1):76 83.
213. Zhan D, Roy MR, Valera C, Cardenas J, Vennari JC, Chen JW, et al. Detection of *Minute virus of mice* using real time quantitative PCR in

assessment of virus clearance during the purification of mammalian cell substrate derived biotherapeutics. *Biologicals*, 2002; 30(4):259-70.

214. Zuñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001; p. 682.